

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ
Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Alimentos

DAYSE ALINE SILVA BARTOLOMEU DE OLIVEIRA

**EXTRAÇÃO, REFINO E CARACTERIZAÇÃO DE ÓLEO DE COPRODUTO
DE ATUM-GALHA-AMARELA (*Thunnus albacares*) RICO EM ÁCIDOS GRAXOS
POLI-INSATURADOS**

Curitiba

2015

DAYSE ALINE SILVA BARTOLOMEU DE OLIVEIRA

**EXTRAÇÃO, REFINO E CARACTERIZAÇÃO DE ÓLEO DE COPRODUTO
DE ATUM-GALHA-AMARELA (*Thunnus albacares*) RICO EM ÁCIDOS GRAXOS
POLI-INSATURADOS**

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-graduação em Engenharia de Alimentos, do Setor de Tecnologia, Universidade Federal do Paraná, como parte das exigências para obter o título de Doutora em Engenharia de Alimentos.

Orientadora: Dra. Nina Waszczynskyj

Curitiba

2015

Oliveira, Dayse Aline Silva Bartolomeu de
Extração, refino e caracterização de óleo de coproduto de atum-
galha-amarela (*Thunnus albacares*) rico em ácidos graxos poli-
insaturados / Dayse Aline Silva Bartolomeu de Oliveira . – Curitiba,
2015.

125 f. : il., tabs.

Tese (doutorado) – Universidade Federal do Paraná, Setor de
Tecnologia, Programa de Pós Graduação em Engenharia de
Alimentos

Orientadora: Nina Waszczyński

Bibliografia: p.120-124

1. Atum (Peixe). 2. Ácidos graxos. 3. Hidrólise. I. Waszczyński,
Nina. II. Título.

CDD 665.3

DAYSE ALINE FERREIRA SILVA BARTOLOMEU DE OLIVEIRA

**EXTRAÇÃO, REFINO E CARACTERIZAÇÃO DE ÓLEO DE
COPRODUTO DE ATUM-GALHA-AMARELA (*Thunnus
albacares*) RICO EM ÁCIDOS GRAXOS POLI-INSATURADOS**

Tese aprovada como requisito parcial para obtenção do grau de
Doutor no Programa de Pós-Graduação em Tecnologia de
Alimentos, da Universidade Federal do Paraná, pela Comissão
formada pelos professores:


Orientadora: Prof^a. Dr^a. NINA WASZCZYŃSKYJ
Setor de Tecnologia, UFPR


Prof. Dr. PAULO GUILHERME VASCONCELOS DE OLIVEIRA
Departamento de Pesca e Aqüicultura, UFRPE


Prof. Dr. EGON SCHNITZLER
Setor de Ciências Exatas e Naturais, UEPG


Dr^a. ROSSANA CATIE BUENO DE GODOY
EMBRAPA Florestas


Prof^a. Dr^a. FRANCINY CAMPOS SCHMIDT
Setor de Tecnologia, UFPR

Curitiba, 11 de setembro de 2015.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus, pois o seu amor me conduziu e renovou as minhas forças, seu amor me deu asas para ir além e ser uma vencedora.

À minha família, minha riqueza, meus pais Antônio e Marleide, minhas irmãs Ava Neide e Leidiane Aisa, e ao mais novo integrante, meu sobrinho e afilhado lindo Antônio Henrique, por nos unir e trazer alegria aos nossos dias! Apesar da distância, vocês estiveram comigo, encorajando-me a seguir sempre em frente.

A Kleiton Ferreira de Oliveira, companheiro de todas as horas, por estar sempre ao meu lado: essa vitória é nossa, meu amor.

À minha querida professora orientadora Dra. Nina Waszczynskyj, por inestimável orientação e amizade em todos os momentos, pelo seu conselho encorajador, mostrando-me que é preciso seguir em frente. Contar com sua orientação foi um presente, a você, professora, minha eterna admiração e gratidão.

Ao Professor Dr. Wilson Rogério Boscolo, por abrir as portas do Departamento de Engenharia de Pesca da Universidade Estadual do Oeste do Paraná e da empresa FALBOM Agroindustrial Ltda. e pelas indispensáveis orientações no desenvolvimento do hidrolisado de atum. Enfim, pelo apoio e amizade de sempre.

À amiga Dra. Silvana Licodiedoff, por possibilitar a parceria com o departamento de Engenharia de Alimentos e Engenharia Química da Universidade Federal de Santa Catarina; pelas inúmeras e valiosas contribuições na construção desse trabalho e, sobretudo pela paciência e amizade. Que essa parceria seja duradoura, amiga.

A esse querido grupo carinhosamente chamado de “curicas”: Roberta de Souza Leone; Fernanda Janaína Gomes da Costa; Silvana Licodiedoff; Mariana Egea, a quem tantas vezes recorri, em momentos de dúvida, e de saudades. Em especial, as “curicas” Ana Mery de Oliveira, Carolina Lopes Leivas e Elaine Caroline Kiatkoski, além da amizade, pelo auxílio nas extrações do óleo de atum e pelas portas abertas do Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular da Universidade Federal do Paraná. Não importa o quão longe a vida nos leve, a certeza de contarmos umas com as outras sempre nos manterá por perto.

Às doutorandas do Departamento de Alimento e Nutrição, da Faculdade de Engenharia de Alimentos da Universidade de Campinas, Danile Miotto e Fernanda Guimarães Drummond e Silva, pela parceria na elaboração do artigo 1 deste trabalho e pelos ensinamentos, vocês têm minha gratidão e admiração.

À amiga Dra. Flávia Sampaio, pelos valiosos ensinamentos no início da minha carreira docente, dividindo comigo a difícil tarefa de ser docente e doutoranda, pelo apoio e experiências compartilhadas no caminho entre Piúma e Guarapari.

À minha prestativa equipe sensorial, em especial, às minhas alunas bolsistas do curso superior em Engenharia de pesca do Instituto Federal do Espírito Santo – Campus Piúma, Ana Paula Silva e Esttefania Rosa Decoté, pelas longas horas de laboratório.

Aos amigos que suavizaram, com seu carinho e incentivo, o dia a dia dessa caminhada: Dr. Marcelo Giordani Minozzo e Msc. Maria Machio Rodrigues, docentes do Instituto Federal do Espírito Santo – Campus Piúma.

Aos meus amados amigos e antigos vizinhos: Ana Paula Dalpra Muller, Gustavo da Silva Muller, meu sobrinho de coração Davi Muller; e, a mais nova integrante dessa família linda, Ana Beatriz Muller, pela acolhida em São José dos Pinhais – PR, por ser minha família nesse lugar, por me fazer esquecer o frio e a saudade da terrinha querida. Sem vocês, não teria persistido nessa caminhada. A distância não é maior que o amor que nos une, por isso, nossa amizade será eterna.

Aos meus queridos amigos Clayton Perônico de Almeida e Tatiane Lemos Perdigão, por terem me escolhido como vizinha me ajudando a fazer dessa cidade, Guarapari – ES, o meu novo lar, pelos almoços de domingo, pelo incentivo, pelas sugestões e observações valiosas para construção e aprimoramento desse trabalho, enfim por estarem sempre presentes. Obrigada por fazerem parte da minha vida.

Às docentes do Instituto Federal do Espírito Santo – Campus Piúma, Dra. Flávia Regina Spago de Camargo Gonçalves e Msc. Sarah Vervloet Soares, pelas valiosas dicas e revisões.

À empresa Fishes Brazil – Piúma/ES, pela gentil doação da matéria-prima deste trabalho, as cabeças de atum.

À empresa FALBOM Agroindustrial Ltda. – Toledo/PR, pelo apoio na produção do hidrolisado de atum e a toda à sua equipe, em especial à querida Dra. Fabiana Dieterich.

À equipe do laboratório de óleos e gorduras da Universidade Federal de Santa Catarina - UFSC - Laboratório de Óleos e Gorduras.

Ao Instituto Federal do Espírito Santo – Campus Piúma e Campus Alegre, em especial a equipe do laboratório de química.

A CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento Pessoal de Nível Superior), pelo apoio financeiro; e à Universidade Federal do Paraná, pela oportunidade de aprimoramento profissional.

E por fim, agradeço aos membros da Banca Examinadora de defesa da Tese: Dr. Egon Schnitzler; Dra. Rossana Catie Bueno de Godoy e Dra. Francini C. Schmidt. E aos suplentes: Dra. Renata Ernlund Freitas de Macedo; Dra. Michele Rigon Spier e em especial ao Dr. Paulo Guilherme Vasconcelos de Oliveira, pelas correções e sugestões que tanto contribuíram para o aperfeiçoamento desse trabalho.

Sei que, por mais que me estenda, não conseguirei agradecer por tudo e a todos que contribuíram para que chegasse até aqui. Difícil foi, mas o que fica são os ensinamentos e os momentos compartilhados, por estes, serei sempre grata.

Muito Obrigada!!!

OLIVEIRA D. A. S. B. **Extração, refino e caracterização de óleo de coproduto de atum-galha-amarela (*Thunnus albacares*) rico em ácidos graxos poli-insaturados.** 2015. Tese (Doutorado em Engenharia de Alimentos) – Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Alimentos, Universidade Federal do Paraná, Curitiba.

RESUMO GERAL

O objetivo geral desse trabalho foi obter óleo refinado e desodorizado de coprodutos (cabeças) de atum (*Thunnus albacares*), rico em ácidos graxos poli-insaturados (AGPI). Esse trabalho foi dividido em quatro capítulos. A revisão bibliográfica no **Capítulo 1** aborda, de forma concisa características sobre o gênero *Thunnus*, propriedades dos resíduos de peixe e a importância do óleo, descrevendo formas de obtenção, refino, desodorização e caracterização química desse óleo, além de apresentar aspectos relevantes sobre hidrólise enzimática e em especial do pescado. O **Capítulo 2** descreve a extração do óleo de cabeças de atum pelo método alternativo via hidrólise enzimática, com o objetivo de estudar a ação da enzima Alcalase na extração de óleo de coprodutos (cabeças) de atum (*Thunnus albacares*) por método alternativo via hidrólise enzimática, bem como na produção de peptídeos antioxidantes a partir de coprodutos (cabeças) de atum (*Thunnus albacares*). Com este estudo, observou-se que a hidrólise enzimática de cabeças de atum, possibilitou a recuperação simultânea de óleo rico em ácidos graxos poli-insaturados (AGPI) e peptídeos com capacidade antioxidante. O **Capítulo 3** aborda sobre a extração do óleo de cabeças de atum, tendo como objetivo avaliar e comparar a qualidade do óleo obtido pela extração por cocção (método industrial) e extrações alternativas por processos a baixa temperatura (Bligh & Dyer e hidrólise enzimática). Os processos de extração influenciaram o perfil de ácidos graxos dos óleos obtidos, principalmente nos teores de AGPI, sendo a metodologia de extração via hidrólise enzimática a que atribuiu as melhores características em relação à qualidade e propriedade funcional do óleo. Por fim, o **Capítulo 4** apresenta o processo de refino e desodorização do óleo extraído de cabeça de atum, com o objetivo de avaliar o efeito do refino químico e da etapa de desodorização no perfil de ácidos graxos e nas características físico-químicas e sensoriais desse óleo, que é obtido pelo método de hidrólise enzimática, processo de extração que apresentou um óleo de melhor qualidade. São consideradas como recomendadas para óleo de peixe rico em AGPI e como o óleo de cabeça de atum as condições estudadas de menor tempo do processo de desodorização. Observou-se que a produção de óleo de cabeças de atum obtido pela metodologia de hidrólise enzimática, bem como o refino e uma desodorização aplicada em menor tempo de duração do processo, apresenta-se como uma boa oportunidade para valorizar cabeças de atum. Foi possível demonstrar, assim, o aproveitamento sustentável de um coproduto da indústria pesqueira (cabeças de atum) para a obtenção de óleo refinado e desodorizado, com alto valor agregado, por apresentar teores elevados de ácidos graxos essenciais EPA e DHA com qualidade química e sensorial. Tais características podem favorecer o uso desse óleo como ingrediente alimentício e gerar possíveis novos mercados fomentando a competitividade da indústria pesqueira.

OLIVEIRA D. A. S. B. **Extraction, refining and characterization of yellowfin tuna (*Thunnus albacares*) co-product, rich in polyunsaturated fatty acids.** 2015. Thesis (Doctorate in Food Engineering) - Postgraduate Program in Food Engineering, Federal University of Paraná, Curitiba.

GENERAL ABSTRACT

The aim of this study was to obtain refined and deodorized oil of yellowfin tuna (*Thunnus albacares*) by-products (heads), rich in polyunsaturated fatty acids (PUFAs). The work was divided in four chapters. The literature review in Chapter 1 discusses briefly the *Thunnus* genus, the properties of fish waste and the oil significance, describing methods of refining, deodorizing and chemically characterize this oil, presenting relevant issues on enzymatic hydrolysis especially of fish. Chapter 2 describes the extraction of tuna head's oil through enzymatic hydrolysis method, in order to study the ability of Alcalase enzyme to produce antioxidant peptides and recovery polyunsaturated fatty acids from co-products. The results showed that enzymatic hydrolysis of tuna co-products allowed the simultaneous extraction of oil, rich in PUFAs, and peptides with antioxidant capacity. Chapter 3 focuses on the oil extraction from tuna heads, aiming to evaluate and compare the quality of the oil obtained by industrial extraction and alternatives methods using low temperature (Bligh & Dyer and enzymatic hydrolysis). Extraction methods influenced the fatty acid profile of the oils obtained, especially in PUFA content, being enzymatic hydrolysis, the technique with better results concerning the quality and functional property of oil. Finally, Chapter 4 presents the chemical refining and deodorizing processes of the oil extracted by enzymatic hydrolysis from by-product of tuna, in order to evaluate the effect of these techniques in fatty acid profile, as the physic-chemical characteristics and sensory analysis. This extraction method presents the best quality oil. The recommended for deodorizing process of fish oil rich in PUFA, such as co-product from tuna oil, are the shorter time conditions. It was observed that the production of tuna by-product oil, obtained by enzymatic hydrolysis method, as well as refining and deodorizing performed in short process duration, presents itself as a good opportunity to enhance co-products tuna. The results showed a sustainable use of a by-product of the fishing industry (tuna heads) to obtain refined and deodorized oil, with high added value, due to high content of essential fatty acids EPA and DHA with chemical quality and sensory. Such features may support the use of this oil as a food ingredient and generate potential new markets by promoting the competitiveness of the fishing industry.

LISTA DE FIGURAS

CAPÍTULO 1

| | |
|--|----|
| FIGURA 1 - DISTRIBUIÇÃO MÉDIA DE PORÇÃO COMESTÍVEL E CABEÇAS DE PEIXE..... | 26 |
| FIGURA 2 - ESQUEMA DE OBTENÇÃO DE FARINHA E ÓLEO DE PESCADO..... | 31 |
| FIGURA 3 - ETAPAS DO REFINO DO ÓLEO BRUTO DO PESCADO..... | 33 |
| FIGURA 4 - ETAPAS DO PROCESSO DE “WINTERIZAÇÃO” | 34 |

CAPÍTULO 2

| | |
|--|----|
| FIGURA 1 – PERCENTUAL DE CADA FASE FORMADA APÓS A CENTRIFUGAÇÃO DO HIDROLISADO PROTEICO DE CABEÇA DE ATUM (HPA) E DA FASE EMULSÃO (FE) CONCENTRADA: FASE ÓLEO (FO); FASE EMULSÃO (FE); FASE AQUOSA (FA)..... | 61 |
| FIGURA 2 – RENDIMENTO (%) DO TEOR DE LIPÍDEOS TOTAIS NA MATÉRIA-PRIMA (MP) OBTIDO PELO MÉTODO PADRÃO SOXHLET DO ÓLEO RECUPERADO APÓS CENTRIFUGAÇÃO (CTF) DO HIDROLISADO PROTEICO DE CABEÇA DE ATUM (HPA) E DA FASE EMULSÃO (FE) CONCENTRADA..... | 62 |

CAPÍTULO 3

| | |
|---|----|
| FIGURA 1 – ANÁLISE DE COMPONENTES PRINCIPAIS (ACP) DAS ANÁLISES FÍSICO-QUÍMICAS (ÍNDICE DE ACIDEZ - IA, ÍNDICE DE SAPONIFICAÇÃO - IS, ÍNDICE DE IODO – II, ÍNDICE DE REFRAÇÃO – IR E ÍNDICE DE PERÓXIDO - IP) E DO PERFIL DE ÁCIDOS GRAXOS DOS ÓLEOS OBTIDOS POR DIFERENTES MÉTODOS DE EXTRAÇÃO | 86 |
|---|----|

CAPÍTULO 4

| | |
|--|-----|
| FIGURA 1 – FICHA UTILIZADA PARA O REGISTRO DA INTENSIDADE DOS DESCRITORES DEFINIDOS PELA EQUIPE SENSORIAL DA ANÁLISE DESCRITIVA QUANTITATIVA DAS AMOSTRAS DE ÓLEO DESODORIZADO DE CABEÇAS DE ATUM | 105 |
| FIGURA 2 – GRÁFICO DO PERFIL DE ODOR DAS AMOSTRAS DE ÓLEO DESODORIZADO* DE CABEÇAS DE ATUM..... | 112 |
| FIGURA 3 – ANÁLISE DE COMPONENTES PRINCIPAIS (ACP) DOS PERFIS DE AGPI DE CADEIAS LONGAS (Araquidônico-ARA, Eicosapentaenóico-EPA e Docosaheptaenóico-DHA), CORRELACIONADOS COM AS ANÁLISES FÍSICO-QUÍMICAS E SENSORIAL DOS ÓLEOS DESODORIZADOS* DE CABEÇA DE ATUM..... | 115 |

LISTA DE TABELAS

CAPÍTULO 1

TABELA 1 – PERCENTUAL DE LIPÍDEO DE ALGUNS CABEÇAS DE PESCADOS ESTUDADOS COMO MATÉRIA-PRIMA PARA OBTENÇÃO DE ÓLEO.....30

TABELA 2 – PRODUÇÃO DE FPH: PRINCIPAIS PROTEASES UTILIZADAS, ESPÉCIES DE PEIXE PESQUISADAS E DIFERENTES APLICAÇÕES38

CAPÍTULO 2

TABELA 1 – CAPACIDADE ANTIOXIDANTE DO HIDROLISADO PROTEICO DE CABEÇA DE ATUM (HPA)57

TABELA 2 – COMPOSIÇÃO DE AMINOÁCIDOS TOTAIS E LIVRES DO HIDROLISADO PROTEICO DE CABEÇA DE ATUM (HPA).....59

TABELA 3 – PERFIL DE ÁCIDOS GRAXOS DO ÓLEO DE CABEÇA DE ATUM RECUPERADO DO HIDROLISADO PROTEICO DE CABEÇA DE ATUM (HPA)63

CAPÍTULO 3

TABELA 1 – ANÁLISES FÍSICO-QUÍMICAS DOS ÓLEOS BRUTOS DE CABEÇAS DE ATUM OBTIDOS PELOS DIFERENTES MÉTODOS DE EXTRAÇÃO³81

TABELA 2 – PERFIL DE ÁCIDOS GRAXOS DOS ÓLEOS BRUTOS DE CABEÇA DE ATUM OBTIDOS POR DIFERENTES MÉTODOS DE EXTRAÇÃO.....84

CAPÍTULO 4

TABELA 1 – VARIÁVEIS INDEPENDENTES CODIFICADAS E REAIS (COM SEUS DIFERENTES NÍVEIS).....102

TABELA 2 – PLANEJAMENTO FATORIAL 2², COM 2 VARIÁVEIS EM 2 NÍVEIS (-1 E +1) ACRESCIDO DE TRÊS REPETIÇÕES NO PONTO CENTRAL, DO ÓLEO DESODORIZADO DE CABEÇA DE ATUM103

TABELA 3 – CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA DOS ÓLEOS BRUTOS E REFINADOS DE CABEÇA DE ATUM².....106

TABELA 4 – PERFIL DE ÁCIDOS GRAXOS DOS ÓLEOS BRUTO E REFINADO DE CABEÇA DE ATUM.....108

TABELA 5 – DESCRITORES PARA O ATRIBUTO ODOR, SUAS DEFINIÇÕES E REFERÊNCIAS INDICADOS PELA EQUIPE DE JULGADORES PARA O ÓLEO DE CABEÇAS DE ATUM.....111

LISTA DE ABREVIATURAS

| | |
|---------|--|
| AAPH | - 2,2'azobis (2-amidino-propano) dihidroclorido |
| ABTS | - 2,2' azinobis (3-etilbenzotiazolina-6-ácido sulfônico) |
| ACP | - Análise de componentes principais |
| AG | - Ácidos graxos |
| AGL | - Ácidos graxos livres |
| AGM | - Ácido graxo monoinsaturado |
| AGPI | - Ácidos graxos poli-insaturados |
| AGPI | - Ácidos graxos poli-insaturados |
| AGPI-CL | - Ácidos graxos poli-insaturados de cadeias longas |
| AGS | - Ácido graxo saturado |
| AOAC | - <i>Association of Official Analytical Chemists</i> |
| AOCS | - <i>American Oil Chemists Society</i> |
| ARA | - Araquidônico |
| BD | - Bligh & Dyer |
| CA | - Cabeças de atum |
| CG | - Cromatografia em fase gasosa |
| CP | - Componentes principais |
| CTF | - Centrifugação |
| DHA | - Ácido docosahexaenoico |
| EPA | - Ácido eicosapentaenoico |
| FA | - Fase Aquosa |
| FAO | - <i>Food and Agriculture Organization</i> |
| FE | - Fase Emulsão |
| FO | - Fase Óleo |
| FPH | - <i>Fish Protein Hydrolysed</i> |
| FRAP | - <i>Ferric Reducing Antioxidant Power</i> |
| GH | - Grau de hidrólise |
| HMG-CoA | - Hidroximetilglutaril Co-A redutase |
| HPA | - Hidrolisado proteico de cabeça de atum |
| HPLC | - Cromatografia líquida |
| HPP | - Hidrolisado proteico de peixe |
| IA | - Índice de acidez |
| II | - Índice de Iodo |
| IP | - Índice de peróxido |
| IR | - Índice de refração |

| | |
|----------|--|
| IS | - Índice de saponificação |
| ND | - Não detectado |
| OB | - Óleo bruto |
| OBD | - Óleo bruto obtido pela extração à baixa temperatura Bligh Dyer |
| OD | - Óleo desodorizado |
| OHE | - Óleo extraído via hidrólise enzimática |
| OI | - Óleo bruto obtido pela extração por cocção (método industrial) |
| OPA | - O-ftaldeído |
| OR | - Óleo refinado |
| ORAC | - <i>Oxygen Radical Absorbance Capacity</i> |
| RP –HPLC | - Cromatografia líquida de fase reversa |
| TE | - Equivalente de trolox |
| TEAC | - <i>Trolox Equivalent Antioxidant Capacity</i> |
| TPTZ | - 2,4,6-Tris(2-piridil)-s-triazina |
| Trolox | - Ácido 2-carboxílico-6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcromano |
| ω | - Ômega |
| Σ | - Somatório |

SUMÁRIO

| | |
|---|-----------|
| 1 JUSTIFICATIVA | 15 |
| 2 OBJETIVOS | 17 |
| 2.1 OBJETIVO GERAL..... | 17 |
| 2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS | 17 |
| REFERÊNCIAS | 19 |
| CAPÍTULO 1 - REVISÃO DE LITERATURA | 21 |
| 1 RESUMO..... | 22 |
| 2 ABSTRACT | 23 |
| 3 O ATUM..... | 24 |
| 4 RESÍDUOS DE PEIXE (COPRODUTOS) | 26 |
| 5 ÓLEO DE PEIXE..... | 28 |
| 5.1 OBTENÇÃO DO ÓLEO | 29 |
| 5.2 REFINO E DESODORIZAÇÃO | 32 |
| 6 HIDRÓLISE ENZIMÁTICA | 36 |
| 6.1 HIDRÓLISE ENZIMÁTICA DE PESCADO..... | 37 |
| REFERÊNCIAS | 39 |
| CAPÍTULO 2 – EXTRAÇÃO DO ÓLEO DE CABEÇAS DE ATUM (<i>THUNNUS ALBACARES</i>) PELO MÉTODO ALTERNATIVO VIA HIDRÓLISE ENZIMÁTICA | 47 |
| 1 RESUMO..... | 48 |
| 2 ABSTRACT | 49 |
| 3 INTRODUÇÃO | 50 |
| 4 MATERIAL E MÉTODOS..... | 52 |
| 4.1 MATERIAL | 52 |
| 4.2 PRODUÇÃO INDUSTRIAL DO HIDROLISADO DE CABEÇAS DE ATUM | 52 |
| 4.3 COMPOSIÇÃO FÍSICO-QUÍMICA | 52 |
| 4.4 GRAU DE HIDRÓLISE | 53 |
| 4.5 CAPACIDADE ANTIOXIDANTE | 53 |
| 4.6 PERFIL DE AMINOÁCIDOS TOTAIS E LIVRES | 54 |
| 4.7 DETERMINAÇÃO DO PERFIL DE ÁCIDOS GRAXOS | 55 |
| 4.8 ANÁLISE ESTATÍSTICA..... | 56 |

| | |
|--|-----------|
| 5 RESULTADOS E DISCUSSÕES | 56 |
| 5.1 CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA DO HIDROLISADO PROTEICO DE CABEÇA DE ATUM..... | 56 |
| 5.2 EFEITO DA ALCALASE NA FRAÇÃO PROTÉICA DO CABEÇA DE ATUM | 56 |
| 5.2.1 Capacidade antioxidante..... | 57 |
| 5.2.2 Perfil de aminoácidos Totais e Livres | 58 |
| 5.3 EFEITO DA ALCALASE NA FRAÇÃO LIPÍDICA DO CABEÇA DE ATUM..... | 60 |
| 6 CONCLUSÃO..... | 65 |
| REFERÊNCIAS | 66 |
| CAPÍTULO 3 - EXTRAÇÃO E COMPARAÇÃO DO ÓLEO DE CABEÇAS DE ATUM (THUNNUS ALBACARES), OBTIDO PELO MÉTODO POR COCÇÃO (INDUSTRIAL), MÉTODO BLIGH E DYER, E VIA HIDRÓLISE ENZIMÁTICA...73 | |
| 1 RESUMO..... | 74 |
| 2 ABSTRACT | 75 |
| 3 INTRODUÇÃO | 76 |
| 4 MATERIAL E MÉTODOS | 77 |
| 4.1 MATERIAL | 77 |
| 4.2 COMPOSIÇÃO QUÍMICA DA MATÉRIA-PRIMA | 77 |
| 4.3 EXTRAÇÃO PELO MÉTODO COM SOLVENTE A FRIO BLIGH & DYER | 77 |
| 4.4 EXTRAÇÃO PELO PROCESSO POR COCÇÃO (INDUSTRIAL) | 78 |
| 4.5 EXTRAÇÃO PELO PROCESSO DE HIDRÓLISE ENZIMÁTICA..... | 78 |
| 4.6 CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA DOS ÓLEOS | 78 |
| 4.6.1 Índice de refração (IR)..... | 78 |
| 4.6.2 Índice de saponificação (IS) | 78 |
| 4.6.2 Índice de peróxido (IP)..... | 79 |
| 4.6.3 Índice de acidez (IA)..... | 79 |
| 4.6.4 Índice de Iodo (II)..... | 79 |
| 4.7 DETERMINAÇÃO DO PERFIL DE ÁCIDOS GRAXOS | 79 |
| 4.8 ANÁLISE ESTATÍSTICA..... | 79 |
| 5 RESULTADOS E DISCUSSÕES | 80 |
| 5.1 ANÁLISE FÍSICO-QUÍMICA DA MATÉRIA-PRIMA E DOS ÓLEOS DE CABEÇAS DE ATUM OBTIDOS POR DIFERENTES MÉTODOS DE EXTRAÇÃO..... | 80 |
| 5.2 PERFIL DE ÁCIDOS GRAXOS DOS ÓLEOS DE CABEÇAS DE ATUM OBTIDOS POR DIFERENTES MÉTODOS DE EXTRAÇÃO | 83 |

| | |
|--|------------|
| 5.3 COMPARAÇÃO DAS ANÁLISES FÍSICO-QUÍMICAS E PERFIL DE ÁCIDOS GRAXOS DOS ÓLEOS DE CABEÇAS DE ATUM OBTIDOS POR DIFERENTES MÉTODOS DE EXTRAÇÃO..... | 85 |
| 6 CONCLUSÃO..... | 89 |
| REFERÊNCIAS | 90 |
| CAPÍTULO 4 - REFINO E DESODORIZAÇÃO DO ÓLEO EXTRAÍDO DE CABEÇA DE ATUM POR HIDRÓLISE ENZIMÁTICA..... | 96 |
| 1 RESUMO..... | 97 |
| 2 ABSTRACT | 98 |
| 3 INTRODUÇÃO | 99 |
| 4 MATERIAL E MÉTODOS | 100 |
| 4.1 MATERIAL | 100 |
| 4.2 EXTRAÇÃO DO ÓLEO DE CO-PRODUTO DE ATUM PELO PROCESSO DE HIDRÓLISE ENZIMÁTICA | 100 |
| 4.3 REFINO DO ÓLEO BRUTO DE CABEÇA DE ATUM..... | 101 |
| 4.3.1 Desodorização do óleo refinado de cabeça de atum | 102 |
| 4.4 CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA DO ÓLEO BRUTO REFINADO E DO ÓLEO DESODORIZADO DE CABEÇA DE ATUM | 103 |
| 4.4.1 Índice de refração (IR)..... | 103 |
| 4.4.2 Índice de saponificação (IS) | 103 |
| 4.4.3 Índice de peróxido (IP)..... | 103 |
| 4.4.4 Índice de acidez (IA)..... | 103 |
| 4.4.5 Índice de Iodo (II)..... | 104 |
| 4.5 DETERMINAÇÃO DO PERFIL DE ÁCIDOS GRAXOS DO ÓLEO BRUTO, REFINADO E DESODORIZADO DE CABEÇA DE ATUM | 104 |
| 4.6 ANÁLISE SENSORIAL DO ÓLEO DESODORIZADO DE CABEÇA DE ATUM.... | 104 |
| 4.6.1 Análise Descritiva Quantitativa (ADQ)..... | 104 |
| 4.7 ANÁLISE ESTATÍSTICA..... | 105 |
| 5 RESULTADOS E DISCUSSÕES | 106 |
| 5.1 CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA DOS ÓLEOS BRUTO E REFINADO DE CABEÇA DE ATUM..... | 106 |
| 5.2 PERFIL DE ÁCIDOS GRAXOS DOS ÓLEOS BRUTO E REFINADO DE CABEÇA DE ATUM..... | 108 |

| | |
|--|-----|
| 5.3 CARACTERIZAÇÃO DOS ÓLEOS DESODORIZADOS DE CABEÇA DE ATUM..... | 110 |
| 5.3.1 Análise sensorial | 110 |
| 5.3.2 Avaliação dos efeitos das variáveis independentes (temperatura e tempo do processo de desodorização) sobre a análise sensorial, as análises físico-químicas e o perfil de ácidos graxos poli-insaturados de cadeia longa do óleo desodorizado de cabeça de atum..... | 113 |
| 6 CONCLUSÃO..... | 119 |
| REFERÊNCIAS | 120 |
| CONCLUSÕES FINAIS | 125 |

1 JUSTIFICATIVA

No Brasil, o aproveitamento de resíduos da industrialização de pescado, também chamados de coprodutos, é baixo. O destino desses resíduos é o preparo de farinha de pescado para rações, um produto de baixo valor, ou então, são armazenados em tanques sem receber qualquer tipo de tratamento seguido de descarte nas imediações do local de processamento, contribuindo para a contaminação ambiental (SEIBEL; SOUZA-SOARES, 2003). A composição química desses coprodutos tem sido alvo de pesquisas devido à presença de compostos lipídicos presentes nos peixes marinhos, sobretudo $\omega 3$, em especial os eicosapentaenoico (EPA) e ácido docosahexaenóico (DHA) (KRIS-ETHERTON; HARRIS; APPEL, 2002; GELEIJNSE *et al.*, 2002; HARRIS, 2004; CARRERO *et al.*, 2005; BALK *et al.*, 2006; WANG *et al.*, 2006; SOUZA; ANIDO; TOGNON, 2007; HARRIS *et al.*, 2008; SILVA *et al.*, 2008; HARRIS *et al.*, 2009; MAZEREEUW *et al.*, 2012).

O óleo de peixe tem sido obtido industrialmente através da digestão e tratamento térmico da matéria-prima não aproveitável no processamento do pescado. Porém, por serem em sua maioria compostos por ácidos graxos poli-insaturados, os lipídeos do pescado são mais susceptíveis à oxidação. Sendo assim, recomenda-se uma extração a baixa temperatura, tais como o dióxido de carbono supercrítico (SCO_2), hidrólise enzimática (LAPLANTE; SOUCHET; BRYL, 2009) e Bligh e Dyer (BLIGH; DYER, 1959). Portanto, a busca por processos mais adequados para a recuperação de lipídeos de “resíduos” de pescados pode ser uma grande oportunidade de reduzir o desperdício e agregar valor a esse coproduto da indústria pesqueira (DUMAY *et al.*, 2009). Entre essas técnicas, a enzimática, que promove a ruptura do tecido do peixe, pode ser uma alternativa promissora para separar os lipídeos de interesse sem comprometer o valor nutritivo, valorizando o óleo, pois mantém as propriedades químicas que ressaltam a qualidade do mesmo, o que pode viabilizar a venda a custos mais elevados para um mercado selecionado (DUMAY; BARTHOMEUF; BERGE, 2004; LINDER; FANNI; PARMENTIER, 2005).

Entretanto, o óleo de peixe marinho possui um odor forte de peixe, considerado não atraente para os consumidores (LIN *et al.*, 1990; OLIVEIRA; MILLER, 2014) e, por isso, tem sido pouco utilizado como ingrediente alimentício. É importante destacar também que o óleo bruto de peixe requer purificação para eliminar componentes não desejados, como pigmentos, resíduos de extração, entre outros, para que esse óleo satisfaça os padrões de qualidade de um produto aceitável para alimentação humana (HAFIDI; PIOCH; AJANA, 2005;

CHOTIMARKORN; BENJAKUL; SILALAI, 2008; KLAYPRADIT; HUANG, 2008; CHUNG; LEE, 2009; CREXI; SOUZA-SOARES; PINTO, 2009; VALENZUELA; SANHUEZA; BARRA, 2012).

Diante do exposto torna-se relevante o estudo de métodos mais eficientes para obtenção de óleo de peixe marinho rico em ácidos graxos poli-insaturados ω -3 a partir de coprodutos, bem como a aplicação de técnicas de refino e desodorização, tornando esses óleos mais atrativos, favorecendo sua utilização como ingrediente alimentar.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Obter óleo refinado e desodorizado de coprodutos (cabeças) de atum (*Thunnus albacares*), rico em ácidos graxos poli-insaturados.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Caracterizar a matéria-prima, coprodutos (cabeças) de atum (*Thunnus albacares*);
2. Estudar a ação da enzima Alcalase na extração de óleo de coprodutos (cabeças) de atum (*Thunnus albacares*) por método alternativo via hidrólise enzimática;
3. Avaliar a ação da enzima Alcalase na produção de peptídeos antioxidantes a partir de coprodutos (cabeças) de atum (*Thunnus albacares*);
4. Extrair óleo de coprodutos (cabeças) de atum (*Thunnus albacares*) pelo método com solvente Bligh e Dyer;
5. Extrair óleo de coprodutos (cabeças) de atum (*Thunnus albacares*) pelo método de cocção e prensagem (método industrial);
6. Comparar, pela caracterização físico-química e perfil de ácidos graxos, a qualidade dos óleos brutos extraídos de coprodutos (cabeças) de atum (*Thunnus albacares*), pelos métodos: de cocção (método industrial), com solvente Bligh e Dyer e pelo método alternativo via hidrólise enzimática;
7. Refinar o óleo bruto extraído de coprodutos (cabeças) de atum (*Thunnus albacares*) obtido pelo método que conferir, ao óleo, melhores características físico-químicas e perfil de ácidos graxos;
8. Desodorizar o óleo bruto extraídos de coprodutos (cabeças) de atum (*Thunnus albacares*) obtido pelo método que conferir, ao óleo, melhores características físico-químicas e perfil de ácidos graxos;

9. Comparar, pela caracterização físico-química e do perfil de ácidos graxos, a qualidade do óleo refinado com o óleo desodorizado obtido pelo método que conferir, ao óleo, melhores características físico-químicas e perfil de ácidos graxos;
10. Fazer a avaliação sensorial do óleo desodorizado, obtido pelo método que conferir, ao óleo, melhores características físico-químicas e perfil de ácidos graxos.

REFERÊNCIAS

- CHOTIMARKORN, C.; BENJAKUL, S.; SILALAI, N. Antioxidative effects of rice bran extracts on refined tuna oil during storage. **Food Research International**, v. 41, p. 616–622, 2008.
- HAFIDI, A.; PIOCH, P.; AJANA, H. Membrane-based simultaneous degumming and deacidification of vegetable oils. **Innovative Food Science and Emerging Technologies**, v. 6, p. 203–212, 2005.
- CHUNG, K.; LEE, K. Removal of trimethylamine by adsorption over zeolite catalysts and deodorization of fish oil. **Journal of Hazardous Materials**, v. 172, p. 922–927, 2009.
- CREXI, V. T.; SOUZA-SOARES, L. A.; PINTO, L. A. A. 2009. Carp (*Cyprinus carpio*) oils obtained by fishmeal and ensilage processes: characteristics and lipid profiles. **International Journal of Food Science and Technology**, v. 44, p. 1642–1648, 2009.
- DUMAY, J.; BARTHOMEUF, C.; BERGÉ, J. P. How enzymes may be helpful for upgrading fish by-products: enhancement of fat extraction. **Journal Aquatic Food Product Technology**, v. 13, p. 69–84, 2004.
- DUMAY, J.; DONNAY-MORENO, C.; BARNATHAN, G.; JAOUEN, P.; BERGE, J. P. Improvement of lipid and phospholipid recoveries from sardine (*Sardina pilchardus*) viscera using industrial proteases. **Process Biochemistry**, v.41, p. 2327–2332, 2006.
- GBOGOURI, G. A.; LINDER, M.; FANNI, J.; PARMENTIER, M. Analysis of lipids extracted from salmon (*Salmo salar*) heads by commercial proteolytic enzymes. **European Journal of Lipid Science and Technology**, v. 108, p. 766–775, 2006.
- KLAYPRADIT, W.; HUANG, Y. Fish oil encapsulation with chitosan using ultrasonic atomizer. **LWT- Food Science and Technology**, v. 41, p. 1133–1139, 2008.
- LINDER, M.; FANNI, J.; PARMENTIER, M. Proteolytic extraction of salmon oil and PUFA concentration by lipases. **Mar Biotechnology**, v. 15, p. 70–76, 2005.
- LAPLANTE, S.; SOUCHET, N.; BRYL, P. Comparison of low-temperature processes for oil and coenzyme q10 extraction from mackerel and herring. **European Journal of Lipid Science and Technology**, v. 111, p. 135–141, 2009.
- SEIBEL, N. F.; SOUZA-SOARES, L. A. Produção de silagem química com resíduos de pescado marinho. **Brazilian Journal Food Technology**, v.6, n.2, p. 333-337, 2003.
- SLIZYTE, R.; RUSTAD, T.; STORRØ, I. Enzymatic hydrolysis of cod (*Gadus morhua*) by-products – optimization of yield and properties of lipid and protein fractions. **Process Biochemistry**, v. 40, p. 3680–3692, 2005.

VALENZUELA, A.; SANHUEZA, J.; BARRA, F. L. El aceite de pescado: ayer un desecho industrial, hoy un producto de alto valor nutricional. **Revista Chilena de Nutrición**, v. 39, n. 2, p. 201-209, 2012.

CAPÍTULO 1 - REVISÃO DE LITERATURA

REVISÃO DE LITERATURA

1 RESUMO

O termo resíduo refere-se a todos os coprodutos e sobras do processamento de alimentos que são de baixo valor comercial. No caso de pescado, o material residual é constituído de aparas, carne escura, peixes fora do tamanho ideal para industrialização, cabeças e carcaças. Os coprodutos de peixes têm sido mais utilizados para a produção de farinha de peixe e de óleo, destinados principalmente para o preparo de alimentos peletizados para a aquicultura. Estudos constataram as propriedades funcionais e nutricionais dos ácidos graxos ômega-3 presentes nos óleos de peixes de origem marinha. A partir daí, o óleo de pescado tornou-se um produto industrial de alto valor agregado. A produção convencional para a obtenção industrial de óleo de peixe para aplicação alimentícia por aquecimento, prensagem e centrifugação é um antigo e bem descrito método, esse processo tradicional é, muitas vezes, considerado de alto custo por exigir grande demanda de energia em várias etapas da produção, sendo necessárias grandes quantidades de matérias-primas para justificar os investimentos e custos de funcionamento. A extração química com solventes orgânicos é outro processo bem estabelecido para se obter óleo de peixe. No entanto, sistemas de extração com solventes também podem extrair compostos não lipídicos que podem impactar negativamente na qualidade do óleo. A aplicação em escala comercial de tais processos pode ser problemática devido a grandes volumes de solvente residual e possível degradação do produto devido ao solvente tóxico. A hidrólise enzimática pode ser um método alternativo para a extração de óleo de peixe por fornecer um processo de baixo custo, que favorece a liberação de lipídeos apartir da matriz de proteína, preservando o valor nutritivo de lipídeos, para sua aplicação na indústria de alimentos.

Palavras-chave: Coprodutos, ácidos graxos ômega-3, óleo de pescado, extração química, hidrólise enzimática, refino químico, odor.

LITERATURE REVIEW

2 ABSTRACT

The residue term refers to all by-products and scraps of food processing that are of low commercial value. The waste material of fish consists of chips, dark meat, fish smaller than the optimum size for processing, heads, and carcasses. Fish by-products are more widely used for the production of fish meal and oil, used mainly for the preparation of food pellets for aquaculture. Studies showed the functional and nutritional properties of omega-3 fatty acids present in seafood from fish oils. Thus, the fish oil became an industrial product with high added value. Conventional production of industrial fish oil for food application is carried out by heating, pressing and centrifugation, which are old and well-described methods. These techniques are often considered expensive, once require large energy demand in various stages of production and need large amounts of raw materials to justify the investment and running costs. Chemical extraction with organic solvents is another well-established process to obtain fish oil. However, extraction with solvent systems can also extract non-lipid compounds which can negatively affect oil quality. The commercial application of such processes can be problematic due to amount of solvent waste and possible degradation of the product due to toxic solvent. The enzymatic hydrolysis may be an alternative method for the fish oil extraction applied to food industry, providing low-cost process and favoring the release of lipids from protein matrix while maintain the nutritional value.

Keywords: By-products, omega-3 fatty acids, fish oil, chemical extraction, enzymatic hydrolysis, chemical refining, odor.

3 O ATUM

São conhecidas oito espécies de atuns, sendo que no sudeste e sul do Brasil são capturadas principalmente as espécies *Thunnus albacares* (Albacora-lage ou Atum-galha-amarela), *T. alalunga* (Atum-voador ou Albacora-branca) e *T. obesus* (Albacora-bandolim ou Atum-cachorra). Essas espécies são de grande importância econômica, sobretudo devido ao elevado valor agregado no mercado internacional (HAZIN; TRAVASSOS, 2007).

Em face do elevado índice proteico e ampla utilização na culinária mundial o atum (gênero *Thunnus*) é um dos grupos de peixe mais importantes do ponto de vista pesqueiro (HAZIN; TRAVASSOS, 2007). De acordo com a FAO (2014), as capturas de espécies de atum totalizaram cerca de 6,8 milhões de toneladas em 2011. As principais espécies capturadas são a albacora-branca ou atum-voador (*Thunnus alalunga*), albacora-bandolim, albacora-cachorra ou albacora-olhão (*Thunnus obesus*), atum-do-sul (*Thunnus maccoyii*) bonito-listrado ou gaiado (*Katsuwonus pelamis*) e albacora-lage ou atum-galha-amarela (*Thunnus albacares*).

O total de atum e afins capturados estabeleceu um novo recorde de mais de 7 milhões de toneladas em 2012. O bonito-listrado (*Katsuwonus pelamis*) foi o atum comercial mais produtivo, alcançando quase 58 % das capturas dos principais atuns em 2011, seguido das espécies atum-galha-amarela (*Thunnus albacares*) e o albacora-olhão (*Thunnus obesus*), ao registrar em torno de 27 % e 8 %, respectivamente (FAO, 2014). Contudo, o bonito-listrado é a maior espécie em termos de volume desembarcado, enquanto a atum-galha-amarela é a maior espécie de atum em termos de comércio internacional (NGUYEN *et al.*, 2011).

Em 2012, o atum foi responsável por 8 % das exportações totais de peixe. Nos últimos três anos, os mercados de atum têm oscilado devido às grandes variações nas capturas. O Japão permanece sendo o principal mercado para o *sashimi* de atum. A demanda por *sashimi* fresco ou refrigerado manteve-se elevada nos Estados Unidos, que é agora o segundo maior mercado para produtos de atum não enlatados, onde o mercado de conservas de atum permaneceu estagnada em 2013, enquanto em toda a Europa, o mercado registrou um crescimento positivo refletido pelo aumento das importações. A demanda por conservas de atum também melhorou em mercados não convencionais, especialmente na Ásia (FAO, 2014).

No Brasil, o atum apresentou um volume de captura de 725 t em 2010, o que significou um acréscimo de 66,90 %, em relação a 2009, quando foram produzidas 240 t. O atum está presente na lista dos principais produtos exportados sejam na forma de conservas, pedaços ou inteiro. No ano de 2010 foram exportados 2.811.622 kg o que representou um valor de 11.193.183 dólares (BRASIL, 2012).

O aproveitamento de resíduos de peixes marinhos vem tornando-se cada vez mais promissor, por ser considerada uma biomassa com propriedades nutricionais elevadas. Os resíduos de atum constituem uma matéria-prima de interesse devido a sua importância econômica mundial e o comércio internacional de conservas (GUERARD *et al.*, 2002). Os resíduos sólidos ou coprodutos gerados pela indústria de conservas de atum podem chegar até 65 % da matéria-prima original, e isso inclui cabeças, ossos, vísceras, brânquias, músculo escuro e pele (FAO, 2014).

4 RESÍDUOS DE PEIXE (COPRODUTOS)

O termo resíduo refere-se a todos os coprodutos e sobras do processamento de alimentos que são de baixo valor comercial. No caso de pescado, o material residual pode ser constituído de aparas do *toilete* ou limpeza antes do enlatamento, carne escura, peixes fora do tamanho ideal para industrialização, cabeças e carcaças (OETTERER, 1994). Durante o processamento, apesar do esforço para maximizar o rendimento dos produtos comestíveis, a produção direta de resíduos ou coprodutos é inevitável. Estima-se que mais de 70 % do total de peixes capturados são processados, gerando uma grande quantidade de resíduos sólidos e coprodutos, o que muitas vezes representam mais de 50 % do total do peso do peixe (SHAHIDI, 2007), conforme observado na FIGURA 1.

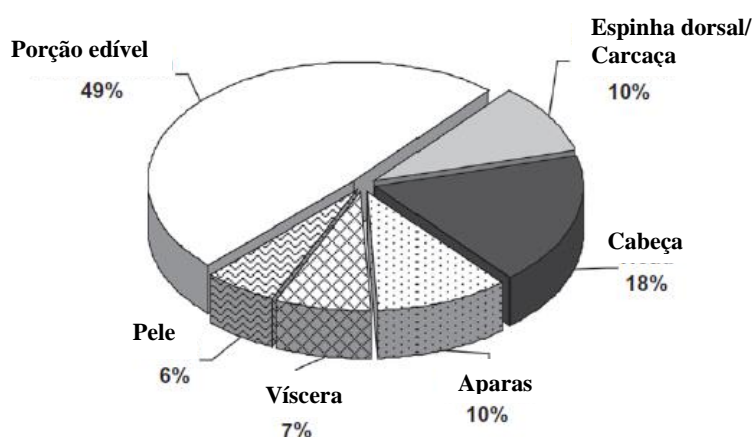


FIGURA 1 - DISTRIBUIÇÃO MÉDIA DE PORÇÃO COMESTÍVEL E COPRODUTOS DE PEIXE
 FONTE: RUBIO-RODRÍGUEZ *ET AL.*, 2012.

A falha ou até mesmo inexistente gestão de resíduos de peixe tem sido um dos maiores problemas de impacto sobre o meio ambiente. O processamento de peixe gera grande volume de desperdício, que pode conter alto conteúdo de nutrientes. Porém, quando não é devidamente processado para utilização na alimentação humana ou animal, este material torna-se suscetível de ser depositado no meio ambiente criando problemas de poluição (KOTZAMANIS *et al.*, 2001); (ARVANITOYANNIS; KASSAVETI, 2008). No entanto, há opções para a gestão desses resíduos e estudos na tentativa de dirimir estes problemas vêm crescendo e ganhando destaque (ARVANITOYANNIS; KASSAVETI, 2008; NGUYEN *et al.*, 2011).

Um passo essencial para o *up-grading* desses resíduos, que passaram de subprodutos a coprodutos para o consumo humano, é a implantação de sistemas como as Boas Práticas de

Fabricação (BPF) e Análise de Perigos e Pontos Críticos de Controle (HACCP) utilizados na produção de alimentos (OLSEN; TOPPE; KARUNASAGAR, 2014).

Um exemplo de transformação de tradicionais coprodutos em alimentos para consumo humano está na indústria de processamento de atum. A maioria dos atuns capturados é enlatada ou utilizada na produção de lombo, apenas músculo branco, resultando em até 60 ou mesmo 70 % de coprodutos (HERPANDI; ROSMA; NADIAH, 2011; SULTANBAWA; AKSNES, 2006). Estes incluem vísceras, cabeça, coluna vertebral, pele, retalhos de barriga e músculo escuro (HERPANDI; ROSMA; NADIAH, 2011). Contudo, o músculo escuro, presente em maior quantidade no atum, pode ter qualidade nutricional ainda melhor que o músculo branco, devido ao conteúdo mais elevado de AGPI ômega-3, certas vitaminas e metais como ferro e cobre (SÁNCHEZ-ZAPATA *et al.*, 2011).

Entre as mais importantes utilizações de resíduos de peixes estão os isolados para cosméticos (colágeno) (NAGAI; SUZUKI, 2000), biogás / biodiesel (óleo) (KATO *et al.*, 2004), fertilizantes, aplicações como dietéticos e para embalagens alimentícias (gelatina, quitosana) (KUMAR, 2000); (ARVANITOYANNIS; NAKAYAMA; AIBA, 1998), isolamento da enzima (protease) (TAVARES; BAPTISTA; MARCONE, 1997); (ZHANG; YAMASHITA; NOZAKI, 2002) e pigmentos naturais (carotenóides) (SHAHIDI; METUSALACH; BROWN, 1998); (SACHINDRA; BHASKAR; MAHENDRAKAR, 2006). Contudo, além dessas utilizações, a produção de farinha de peixe e óleo é a mais utilizada em todo o mundo.

Os resíduos de pescado apresentam alto teor de proteínas, minerais e lipídeos (RUSTAD, 2003). O conteúdo lipídico apresenta conteúdos apreciáveis de ácidos graxos poli-insaturados, principalmente das séries ômega-3 (n-3) e ômega-6 (n-6). Nestas séries de ácidos graxos, destacam-se o ácido alfa-linolênico (LNA, 18:3n-3) e linoleico (LA, 18:2n-6). Estes ácidos são considerados estritamente essenciais, ou seja, não são sintetizados pelo organismo humano, sendo fundamental a sua ingestão na dieta (BELDA *et al.*, 1991).

5 ÓLEO DE PEIXE

Originalmente, o óleo de peixe era um "subproduto" da fabricação da farinha de peixe, um produto valioso amplamente utilizado na nutrição animal. Alguns relatos constam que inicialmente as fábricas produtoras de farinha de pescado jogavam ao mar o óleo produzido durante a prensagem dos pescados. Posteriormente, devido às emergentes demandas ambientais e ecológicas, o óleo era enterrado em valas ou esporadicamente utilizado como combustível nas caldeiras de geração de vapor para fabricação de farinha (VALENZUELA; SANHUEZA; BARRA, 2012).

Na década de sessenta, constatou-se o início da utilização do óleo de peixe hidrogenado para a fabricação de gorduras e margarinas de mesa, bem como na forma não hidrogenada na fabricação de tintas e vernizes devido as suas propriedades de secagem. O processo de hidrogenação permite transformar o óleo de peixe, altamente poli-insaturado, em um produto sólido ou semissólido, de menor insaturação e maior estabilidade, o que é muito apropriado para a fabricação industrial de gorduras e margarinas de mesa (GRIMALDI *et al.*, 1998).

Além da utilização no preparo de gorduras e margarinas, o óleo de peixe começou a ser utilizado na fabricação de óleos comestíveis. Frações de óleo de peixe, hidrogenadas seletivamente e adequadamente desodorizadas, foram misturadas com diferentes proporções de óleo vegetal (soja, girassol etc.) para preparar óleos comestíveis a baixo custo, produtos conhecidos no Chile e Peru como “combinados” que eram expedidos a granel em tambores e recipientes pequenos (VALENZUELA; UAUY, 1999).

A crescente atividade de aquicultura teve início na Noruega, Canadá, Escócia, China e mais tarde no Chile e começou a gerar uma grande demanda de óleo e farinha de peixe para o preparo de alimentos peletizados para o salmão (*Salmo salar*) e a truta (*Oncorhynchus mykiss*). Quase paralelamente começaram a serem identificadas as propriedades nutricionais e funcionais dos ácidos graxos ômega-3 presentes nos óleos de origem marinha (até 30 % ou mais de EPA + DHA) (VALENZUELA; SANHUEZA; BARRA, 2012).

A composição do óleo depende da espécie, da dieta, da idade, do sexo e do tamanho do peixe, além da temperatura ambiental, da sazonalidade e da ocorrência geográfica da espécie. O óleo de peixe contém os mesmos tipos de ácidos graxos que outros óleos e gorduras. A diferença encontra-se em seu conteúdo de ácidos graxos poli-insaturados (AGPI), por serem ricos em AGPI de cadeia longa da família ômega-3 (OGAWA; MAIA, 1999). Estes ácidos graxos, especialmente o ácido eicosapentaenoico (EPA) e ácido docosahexaenoico

(DHA), são hoje altamente valorizados por suas propriedades profiláticas, em diversas enfermidades e demandas nutricionais, as quais têm sido amplamente demonstradas pela literatura científica e médica (VALENZUELA; UAUY, 1999; SANHUEZA; NIETO; VALENZUELA, 2004; LEE *et al.*, 2008). Pesquisas demonstram que o ácido docosahexaenoico (DHA) (série ômega-3) é considerado o ácido graxo poli-insaturado (AGPI) mais importante no desenvolvimento neonatal, é essencial para o desenvolvimento da retina e do cérebro do feto (BIRCH *et al.*, 2000; VALENZUELA; NIETO, 2003; SAN GIOVANNI; CHEW, 2005) e junto com o ácido linoleico têm sido sugerido para diminuir características de obesidade (CHEN *et al.*, 2012a; CHEN *et al.*, 2012b). Assim, o óleo de pescado tornou-se um produto industrial de alto valor nutricional e terapêutico (VALENZUELA; SANHUEZA; BARRA, 2012).

Embora os peixes sejam uma importante fonte alimentar dos ácidos graxos altamente insaturados, especialmente o ácido eicosapentaenoico (EPA) e ácido docosahexaenoico (DHA), esses animais não são capazes de sintetizar AGPI de cadeia longa. Eles adquirem esses AGPI através de fitoplânctons ou peixes menores que se alimentam dessas microalgas que usualmente são ricas em AGPI essenciais (LUNN; THEOBALD, 2006). Assim, a composição de ácidos graxos dos lipídeos dos peixes é influenciada por suas fontes alimentares (MOLKENTIN *et al.*, 2015).

5.1 OBTENÇÃO DO ÓLEO

O óleo de peixe pode ser obtido a partir de peixes inteiros, fauna acompanhante (espécies sem valor comercial) da pesca, ovas, subprodutos da produção de conservas e surimi e de coprodutos do processamento do pescado (ADEOTI; HAWBOLDT, 2014). Em espécies de peixes magros, o fígado é o principal depósito de lipídeos que consistem principalmente de triacilgliceróis e os lipídeos musculares consistem de fosfolipídeos. (FALCH; RUSTAD; AURSAND, 2006). O percentual de lipídeos de alguns coprodutos estudados como matéria-prima para obtenção de óleo a partir de resíduos de peixe está apresentado na TABELA 1.

TABELA 1 - PERCENTUAL DE LIPÍDEO DE ALGUNS COPRODUTOS DE PESCADOS ESTUDADOS COMO MATÉRIA-PRIMA PARA OBTENÇÃO DE ÓLEO

| COPRODUTO | % LIPÍDEO | REFERÊNCIAS |
|--|-----------|----------------------------------|
| Visceras: | | |
| Sardinha (<i>Sardina pilchardus</i>) | 4,9 | Dumay <i>et al.</i> , 2006 |
| | 4,89 | Kechaou <i>et al.</i> , 2009 |
| Choco (<i>Sepia officinalis</i>) | 4,92 | Kechaou <i>et al.</i> , 2009 |
| Cod (<i>Gadus morhua</i>) | 21,0 | Slizyte <i>et al.</i> , 2005 |
| Carpa (<i>Cyprinus carpio</i>) | 13 | Crexi; Souza-Soares; Pinto, 2009 |
| Atum (<i>Thunnus albacares</i>) | 3,7 | Nguyen <i>et al.</i> , 2011 |
| Cabeças: | | |
| Salmão (<i>Oncorhynchus nerka</i>) | 14,5 | Sathivel, <i>et al.</i> , 2005 |
| Salmão (<i>Salmo salar</i>) | 21,5 | Gbogouri <i>et al.</i> , 2006 |
| Sardinha (<i>Sardina pilchardus</i>) | 5,8 | Dumay <i>et al.</i> , 2009 |
| Bonito (<i>Katsuwonus pelamis</i>) | 4,8 | Chantachum <i>et al.</i> , 2000 |
| Atum (<i>Thunnus albacares</i>) | 13,5 | Nguyen <i>et al.</i> , 2011 |
| Mix de coprodutos (cabeças, vísceras, espinha dorsal, pele e aparas): | | |
| Peixe-espada-preto (<i>Aphanopus carbo</i>) | 10,13 | Batista <i>et al.</i> , 2010 |
| Ova: | | |
| Arenque (<i>Clupea harengus</i>) | 5,35 | Xiao; Mjøs; Haugsgjerd, 2012 |
| Nadadeira caudal: | | |
| Atum (<i>Thunnus albacares</i>) | 3,3 | Nguyen <i>et al.</i> , 2011 |

O aprimoramento de técnicas de extração de lipídeos de descartes de pesca oferece uma grande oportunidade para reduzir o desperdício e aumentar o lucro de um valioso subproduto (DUMAY *et al.*, 2009). A produção convencional para a obtenção industrial de óleo de peixe para aplicação alimentícia é um antigo e bem descrito método que consiste na digestão da matéria-prima por tratamento térmico (95-100 °C) (OLSEN; TOPPE; KARUNASAGAR, 2014) (FIGURA 2).

Esse método envolve as etapas de cozimento, prensagem e/ou filtração e centrifugação do material. O cozimento da massa é essencial para a liberação da água e do óleo do material durante o tratamento com alta pressão para evitar a deterioração microbiana do peixe; a prensagem tem a finalidade de remover a porção líquida do material, a qual é submetida à

filtração seguida de centrifugação, dando origem a duas porções: a porção líquida e a porção sólida. A porção líquida, recuperada na centrifugação é conhecida como licor de prensagem, é composta de sólidos solúveis e óleo bruto. A porção sólida, conhecida como torta de prensagem, é composta de sólidos úmidos. A fase aquosa é evaporada até elevado teor de matéria seca (LEE, 1963; OLSEN; TOPPE; KARUNASAGAR, 2014). Este processo tradicional é muitas vezes considerado de alto custo, por exigir grande demanda de energia elétrica em várias etapas da produção, sendo necessárias grandes quantidades de matérias-primas para justificar os investimentos e custos de funcionamento (NAYLOR *et al.*, 2009).

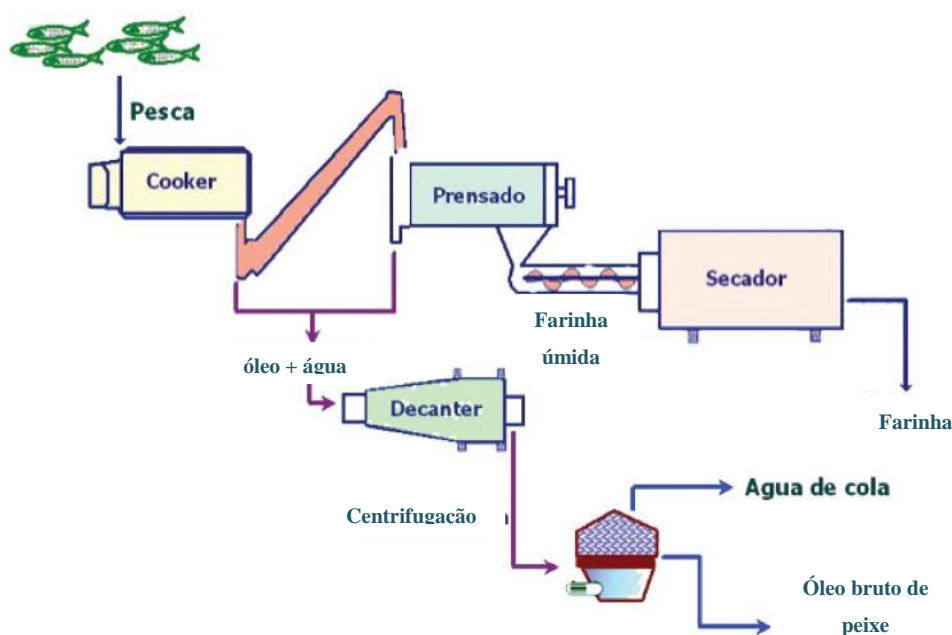


FIGURA 2 - ESQUEMA DE OBTENÇÃO DE FARINHA E ÓLEO DE PESCAO
 FONTE: VALENZUELA; SANHUEZA; BARRA, (2012).

A extração química com solventes orgânicos é outro processo bem estabelecido para se obter óleo de peixe. Soxhlet (AOCS Ba 3-38, 2001), hidrólise ácida (ISO 6492, 1999) e Bligh e Dyer (1959) são os métodos dominantes para a avaliação do teor de lipídeos em ingredientes alimentícios e alimentos para animais. Os processos químicos resultam em rendimentos elevados de lipídeo total. No entanto, sistemas de extração com solventes também podem extrair compostos não lipídicos que podem impactar negativamente a qualidade do óleo. A aplicação em escala comercial de tais processos pode ser problemática devido a grandes volumes de solvente residual e possível degradação do produto devido ao solvente tóxico (ADEOTI; HAWBOLDT, 2014).

Os lipídeos do pescado, em sua maioria poli-insaturados, são susceptíveis a oxidação e degradação. Assim, processos de extração à baixa temperatura, tais como o dióxido de carbono supercrítico (SCO₂) e hidrólise enzimática (LAPLANTE; SOUCHET; BRYL, 2009) podem gerar frações lipídicas mais estáveis. A ruptura enzimática do tecido pode ser uma técnica alternativa válida para liberar os lipídeos naturais do peixe sem comprometer o valor nutritivo destes, que poderão ter melhor aplicação na indústria alimentícia (LINDER; FANNI; PARMENTIER, 2005).

Depois de algumas etapas de refino ou purificação na qual se eliminam componentes não desejados, como pigmentos, resíduos, entre outros (CMOLIK; POKORNY, 2000), o óleo pode ser comercializado em diferentes mercados: alimentação animal, alimentação humana e mais recentemente na indústria farmacêutica, nutracêutica e de suplementos alimentares como óleos, ésteres etílicos de ácidos graxos e glicerídeos parciais (misturas de mono e diglicerídeos) (VALENZUELA; SANHUEZA; BARRA, 2012).

5.2 REFINO E DESODORIZAÇÃO

O óleo de pescado, assim como outros tipos de óleos e gorduras, necessita ser purificado para ser utilizado de maneira mais nobre, como na alimentação humana (MORAIS *et al.*, 2001). O processo de refino (FIGURA 3) busca purificar esse óleo removendo os componentes diferentes dos triacilgliceróis, que afetam a estabilidade do produto de maneira adversa, conferindo ao óleo melhores características (SALAS *et al.*, 2003; CUNHA; SOUZA-SOARES; PINTO, 2002).



FIGURA 3 - ETAPAS DO REFINO DO ÓLEO BRUTO DO PESCADO
 FONTE: CREXI *ET AL.*(2007).

Como o óleo bruto de pescado contém os mesmos tipos de compostos ou impurezas presentes em outros óleos e gorduras brutos, destinados para fins comestíveis, estas substâncias podem ser removidas pelos mesmos processos que são utilizados para os óleos vegetais (PIGOTT; TUCKER, 1987). Dentre os tipos de refino de óleos existentes, o refino químico permite o processamento de óleo de qualquer natureza, mesmo com alto teor de fosfatídios, como é o caso do óleo de pescado (RITTNER, 1996).

O refino químico ou alcalino inclui a degomagem, neutralização e lavagem, clarificação (branqueamento e filtração) e desodorização (MORAIS *et al.*, 2001). Uso de técnicas “amigas da natureza”, como tratamento enzimático é eficaz, mas, como as enzimas são caras, é raramente praticado na indústria. A perspectiva futura é desenvolver processos de refino integrado e sustentável, levando em consideração o custo. Várias pesquisas relatam a investigação de membranas para uma ou duas etapas de refino. Processos com membranas podem atender a demanda atual de métodos eficientes e sustentáveis. Embora a investigação sobre o uso de membranas venha acontecendo nas últimas décadas, poucas aplicações comerciais têm sido relatadas e, devido à complexidade da composição dos óleos de peixe, torna-se difícil a aplicação do processo com membrana no refino desse óleo (VAISALI *et al*, 2015). Portanto, o refino químico ainda se mostra mais adequado.

O processo de “winterização” (FIGURA 4) envolve o arrefecimento do óleo que permite a cristalização da porção sólida e a subsequente filtração das duas fases. A “winterização” foi originalmente aplicada décadas atrás, quando o óleo de sementes foi submetido à temperatura de congelamento para realizar o processo de remoção de sólidos por filtração e cristalização controlada. É uma forma de fracionamento ou a remoção de sólidos a temperaturas selecionadas. Ela envolve a remoção de uma pequena quantidade do material cristalizado a partir de óleos alimentares por filtração para evitar a turvação das frações líquidas a temperaturas de refrigeração. Em um processo comum, o óleo é arrefecido lentamente até cerca de 6 °C, durante um período de 24 h. O arrefecimento é interrompido e a mistura de óleo é deixada em repouso durante 6-8 h. Após a filtração obtêm-se 75-80 % de óleo líquido (LÓPEZ-MARTÍNEZ; CAMPRA-MADRID; GUIL-GUERRERO, 2004).

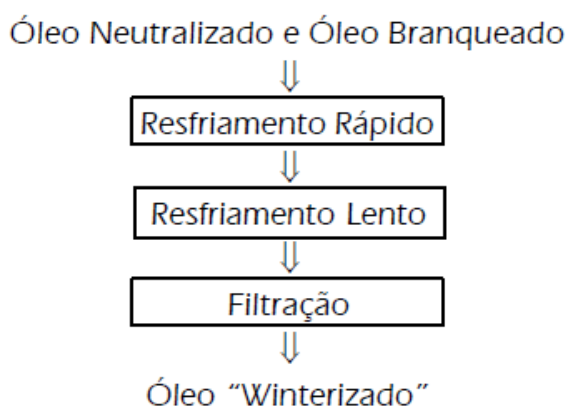


FIGURA 4 - ETAPAS DO PROCESSO DE “WINTERIZAÇÃO”
 FONTE: CUNHA; SOUZA-SOARES; PINTO, 2002.

O óleo de peixe marinho tem um odor forte de peixe, e por isso vem sendo pouco utilizado como ingrediente alimentício (CHUNG; LEE, 2009). As substâncias odoríferas em óleo geralmente são subprodutos da degradação de lipídeos, proteínas e aminoácidos, que podem ser desencadeados por deterioração microbiana e autoxidação. Para solucionar tal problema, a desodorização é o processo adotado para remover aldeídos e cetonas que são responsáveis pelo odor característico de óleo de peixe, o que na maioria dos casos não é atraente para os consumidores (LIN *et al.*, 1990; OLIVEIRA; MILLER, 2014).

O óleo obtido a partir de resíduos do pescado pode ser insípido e inodoro. Contudo, a desodorização representa um passo crítico no processo de refino, uma vez que envolve a alta temperatura que pode provocar reações de degradação (CMOLIK; POKORNY, 2000). Pesquisas apontam para os métodos de remoção do odor, sobretudo de peixe, à baixa temperatura para evitar a degradação do óleo. Chung e Lee (2009) estudaram a desodorização

à baixa temperatura do óleo de peixe cru, com a utilização de zeólitos microporosos, pela adsorção de trimetilamina, que é uma amina volátil da decomposição de plantas e animais e apresenta odor forte e desagradável característico de peixe em decomposição (Dyer, 1945),

Caracterização do óleo

O óleo de peixe tem importantes aplicações nos setores alimentícios, farmacêutico, cosmético e em produtos de pintura. Devido a estas grandes áreas de aplicações, a qualidade e a estabilidade do óleo de peixe ganharam mais importância. Devido ao seu elevado teor de ácidos graxos poliinsaturados, incluindo ácido eicosapentaenoico (EPA) e ácido docosahexaenoico (DHA), óleos de peixe são altamente susceptíveis à deterioração oxidativa (HUSS, 1988) e sua taxa de oxidação difere significativamente de outros óleos. A auto-oxidação de óleos de peixe é a causa mais importante de deterioração da qualidade. Sabores e odores indesejáveis se desenvolvem em uma fase inicial de oxidação (BORAN; KARAÇAM; BORAN, 2006).

Para avaliar a estabilidade do óleo e o monitoramento da deterioração durante o armazenamento, os métodos usados incluem o índice de peróxido, ácido tiobarbitúrico (TBA), valor de acidez e matéria não saponificável. Existem alguns limites importantes estabelecidos por agências reguladoras de qualidade e aceitabilidade de óleos para o consumo humano. Por exemplo, 8 mEqO₂/kg de óleo é o limite de aceitabilidade do índice de peróxido e, para o valor de TBA, este limite é de 7 a 8 malonaldeído mg/kg de óleo (HUSS, 1988).

A determinação do índice de iodo (II) e índice de saponificação (IS) de gorduras e óleos é muito importante para estimar o grau de insaturação. Especialmente as determinações de II e IS de óleos de peixe são necessárias para definir a sua qualidade, devido à variação na composição de ácidos graxos do óleo de peixe, influenciada por fatores como estação do ano e área de captura. Além disso, os óleos brutos podem conter não só triacilglicerol (TAG), mas também outros compostos como cera de éster ou diacilgliceriléter (DAGE) (ENDO; TAGIRI-ENDO; KIMURA, 2005).

O conteúdo de lipídeos totais e a composição de ácidos graxos são fatores utilizados para a avaliação do valor nutricional dos alimentos (XIAO; HAUGSGJERD, 2012). Os procedimentos convencionais utilizados para a determinação de ácidos graxos envolvem a extração de gordura com éter dietílico seguido por conversão dos ácidos graxos de seus ésteres metílicos e análise por cromatografia capilar gasosa (FERNÁNDEZ-CABANÁS *et al.*, 2011).

A proporção de ácidos graxos ômega-3:ômega-6, em razão de serem facilmente oxidados ou degradados por outras reações, bem como pelas suas propriedades profiláticas e

terapêuticas em diversas enfermidades e situações nutricionais, pode ser considerada também como um indicador útil da qualidade e de valores nutricionais em óleos de peixe (JABEEN; CHAUDHRY, 2011; XIAO; MJØS; HAUGSGJERD, 2012; VAN DEN ELSEN *et al.*, 2013; VAN DEN ELSEN *et al.*, 2014).

6 HIDRÓLISE ENZIMÁTICA

Os hidrolisados são frações com alto teor de proteínas (73-85 %) obtidos por autólise (apenas sob a ação de enzimas endógenas) ou heterólise (com a adição de enzimas exógenas). A utilização de enzimas como agentes de modificação de propriedades funcionais de proteínas tem se difundido bastante na indústria de alimentos. As enzimas mais utilizadas para esse fim são as proteases, que se destacam devido às suas aplicações comerciais e às vantagens que apresentam em relação aos demais agentes utilizados para este fim. Durante a hidrólise enzimática a protease vai clivar ligações peptídicas entre dois aminoácidos adjacentes na sequência primária de uma proteína, gerando, pelo menos, dois peptídeos (DUMAY, 2006).

A utilização de proteases específicas apresenta algumas vantagens sobre a hidrólise alcalina ou ácida, como a especificidade, o controle do grau de hidrólise e as condições moderadas de ação, evitando pH e temperaturas extremas, que poderiam prejudicar a qualidade nutritiva do hidrolisado. Além disso, as enzimas podem ser empregadas em concentrações muito baixas, sendo desnecessária sua remoção (ZAVAREZE *et al.*, 2009).

A modificação da estrutura da proteína pela hidrólise enzimática é empregada com o intuito de melhorar as propriedades funcionais tais como, solubilidade, emulsificação e formação de espuma (BHASKAR *et al.*, 2007; SILVA; SILVESTRE, 2003). Segundo Roman e Sgarbieri (2005), os parâmetros mais importantes a serem controlados na hidrólise são a concentração da proteína, relação enzima/substrato, pH e temperatura, além da especificidade e propriedades da enzima. O conhecimento desses fatores é importante, uma vez que a otimização dos parâmetros da hidrólise enzimática é essencial para desenvolver um processo ótimo e econômico (KUROZAWA, PARK; HUBINGER, 2009).

O controle das condições de hidrólise enzimática e a escolha correta da enzima permitem a obtenção de produtos com características adequadas, a uma dada aplicação na formulação de alimentos (KUROZAWA, PARK; HUBINGER, 2009). As enzimas envolvidas podem vir de diferentes origens. Elas podem ser de uma purificação de enzimas digestivas,

extraídas de plantas (papaína, bromelina) ou da indústria de engenharia genética, produzidas a partir de culturas de bactérias, fungos ou leveduras (DUMAY, 2006).

6.1 HIDRÓLISE ENZIMÁTICA DE PESCADO

A adição de enzimas para a produção de hidrolisado de peixe data após a Segunda Guerra Mundial e, inicialmente, era utilizada como fonte de nitrogênio amínico para a cultura de microrganismos. Atualmente, os hidrolisados proteicos de peixe são utilizados para modificar propriedades funcionais de alimentos, como fonte de pequenos peptídeos e aminoácidos. (GILDBERG, 1992; BOSCOLO; FEIDEN, 2007; FURLAN e OETTERER, 2002).

Denominado pela sigla FPH (*Fish Protein Hydrolysated*), conforme designado pela *Food and Agriculture Organization* (FAO), esse produto pode atingir uma concentração de proteína de 90 %, além de apresentar propriedades funcionais úteis para a indústria alimentícia (OETTERER, 2001). O princípio básico para a obtenção do FPH envolve a quebra hidrolítica das longas cadeias de moléculas proteicas pela adição de enzimas vegetais ou por proteases microbianas. Vários processos e técnicas têm sido propostos, aproveitando peixes inteiros, músculos e resíduos de processamento (VIEGAS, 2000). Algumas das principais proteases utilizadas na produção de FPH e uma visão geral das espécies de peixe já estudadas, bem como as diferentes aplicações para os hidrolisados obtidos, são apresentadas na TABELA 2.

TABELA 2 - PRODUÇÃO DE FPH: PRINCIPAIS PROTEASES UTILIZADAS, ESPÉCIES DE PEIXE PESQUISADAS E DIFERENTES APLICAÇÕES

| APLICAÇÃO | MATÉRIA-PRIMA UTILIZADA | ENZIMA (FONTE) | REFERÊNCIAS |
|--|---|--|--|
| Atividade biológica (Peptídeos ativos inibidores da Enzima Conversora de Angiotensina) | Salmão (<i>Salmo salar</i>) (Resíduo – Nadadeira peitoral) | Alcalase (Bactéria) Neutrase (Bactéria) Protamex (Bactéria) Flavourzyme (Fungo) Pepsina (Vísceras animal) Tripsina (Vísceras animal) Neutrase (Bactéria) | Ahn <i>et al.</i> , 2012 |
| Solubilização do nitrogênio | Vísceras de bacalhau do Atlântico (<i>Gadus morhua</i> L.) | Alcalase (Bactéria) Protamex (Bactéria) Papaina (Caule de mamão) Bromelina (Caule de abacaxi) | Aspmo <i>et al.</i> , 2005 |
| Recuperação de proteínas | Atum (<i>Thunnus albacares</i>) (Vísceras, cabeças e Nadadeira caudal) | Protamex (Bactéria) | Nguyen <i>et al.</i> , 2011 |
| Teor de proteína | Molusco bivalve (<i>Anadara granosa</i>) inteiro (com casca) | Alcalase (Bactéria) | Amiza ; Masitah, 2012 |
| Recuperação de colágeno peptídico | Escama de peixe (<i>Sparus aurata</i>) | Esperase (Bactéria) | Mosquera <i>et al.</i> , 2014 |
| Avaliação das propriedades funcionais para alimentos (solubilidade, emulsificação, formação de espuma) | Surimi preparado com co-produtos de carpa prateada (<i>Hypophthalmichthys molitrix</i>) | Alcalase (Bactéria) Protamex (Bactéria) | Liu <i>et al.</i> , 2014 |
| Elaboração de um realçador de sabor (Sabor de frutos do mar) | Alga marinha vermelha (<i>Gracilaria fisheri</i>) | Bromelina (Caule de abacaxi) | Laohakunjit; Selamassakul; Kerdchoechuen, 2014 |
| Propriedade antioxidante | Peixe carapau (<i>Decapterus maruadsi</i>) | Pepsina (Vísceras) Tripsina (Vísceras) Alcalase (Bactéria) Papaina (Caule de mamão) Neutrase (Bactéria) | Jiang <i>et al.</i> , 2014 |
| Propriedade antioxidante | Ostra (<i>Crassostrea talienwhanensis</i>) | Subtilisina (Bactéria) | Wang <i>et al.</i> , 2014 |

Acredita-se que a hidrólise enzimática pode ser um método viável para utilização dos coprodutos da indústria pesqueira, recentemente vistos como um recurso potencial em vez de serem descartados como resíduos. Esse processo pode ser usado para recuperar biomoléculas como lipídeos, proteína hidrolisada e colágeno a partir de resíduos do processamento de peixe, sendo uma alternativa viável para aproveitar a carga orgânica produzida, evitando que essa seja descartada como resíduo, reduzindo assim o problema da poluição e adicionando possivelmente economia à indústria pesqueira (HATHWAR *et al.*, 2011).

De acordo com o conteúdo apresentado na TABELA 2, observa-se que a utilização da fração de proteína desses hidrolisados prevalece. No entanto, a utilização de hidrolisados com

interesse na recuperação dos lipídeos, cresce gradualmente (DUMAY, 2006). Autores afirmam que o processo de hidrólise enzimática pode ser efetivamente usado para recuperar biomoléculas como lipídeos (SLIZYTE; RUSTAD; STORRØ, 2005; DAUKSAS *et al.*, 2005; LAPLANTE; SOUCHET; BRYL 2009; BATISTA *et al.*, 2010). Além disso, os lipídeos recuperados nesse processo são ricas fontes de AGPI, que têm vários benefícios à saúde (DUMAY; BARTHOMEUF; BERGE, 2004; GBOGOURI *et al.*, 2006; DUMAY *et al.*, 2009; HATHWAR *et al.*, 2011; RAI; BHASKAR; BASKARAN, 2013).

O uso de enzimas como proteases, pode ser uma solução alternativa para as atuais condições de processo que destroem componentes valiosos nos óleos e óleos de melhor qualidade podem criar novos mercados e obter preços mais elevados (DUMAY; BARTHOMEUF; BERGE, 2004). Contudo, poucos trabalhos têm sido feitos para otimizar essas condições extrativas, bem como a purificação desse óleo.

REFERÊNCIAS

- ADEOTI, I. A.; HAWBOLDT, K. A review of lipid extraction from fish processing by-product for use as a biofuel. **Biomass and Bioenergy**, v.63, p.330-340, 2014.
- AHN, C.; JEON, Y.; KIM, Y.; JE, J. Angiotensin i converting enzyme (ACE) inhibitory peptides from salmon byproduct protein hydrolysate by alcalase hydrolysis. **Process Biochemistry**, v. 47, n.12, p. 2240–2245, 2012.
- AMERICAN OIL CHEMISTS SOCIETY (AOCS). **Official and Tentative Methods of American Oil Chemists Society**. n. 3. 2001.
- AMIZA, M. A.; MASITAH, M. Optimization of enzymatic hydrolysis of blood cockle (*Anadara granosa*) using Alcalase®. **Borneo Science**, v. 31, p. 2012.
- ARVANITOYANNIS, I. S.; KASSAVETI, A. Fish industry waste: treatments, environmental impacts, current and potential use. **International Journal of Food Science and Technology**, n. 43, p. 726–745, 2008.
- ARVANITOYANNIS, I.; NAKAYAMA, A.; AIBA, S. Chitosan and gelatin based edible films: state diagrams, mechanical and permeation properties. **Carbohydrate Polymers**, v. 37, p. 371–382, 1998.
- ASPMO, S. I.; HORN, S. J.; EIJSINK, V. G. H. Enzymatic hydrolysis of atlantic cod (*Gadus morhua* l.) viscera. **Process Biochemistry**. v. 40, p. 1957-1966, 2005.
- BATISTA, I.; RAMOS, C.; COUTINHO, J.; BANDARRA, N. M.; NUNES, M. L. Characterization of protein hydrolysates and lipids obtained from Black scabbardfish (*Aphanopus carbo*) by-products and antioxidative activity of the hydrolysates produced **Process Biochemistry**, v. 45, p.18–24, 2010.
- BELDA, M. C. R.; POURCHET-CAMPOS, M. A. Ácidos graxos essenciais em nutrição: uma visão atualizada. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 11, n. 1, p. 5-35, 1991.
- BHASKARA, N.; MODIA, V. K.; GOVINDARAJUB, K.; RADHAB, C.; LALITHAB, R. G. Utilization of meat industry by products: protein hydrolysate from sheep visceral mass, **Bioresource Technology**, v. 98, n. 2, p. 388–394, 2007.
- BLIGH, E. G.; DYER, W. J. A rapid method of total lipid extraction and purification. **Canadian Journal Biochemistry Physiology**, v. 37, p. 911-917, 1959.
- BORAN, G.; KARAÇAM, H.; BORAN, M. Changes in the quality of fish oils due to storage temperature and time. **Food Chemistry**. v. 98, p. 693–698, 2006.
- BOSCOLO, W. R, FEIDEN, A. **Industrialização de Tilápias**. Toledo: GFM, 2007. p. 270
- BRASIL. **Boletim Estatístico da Pesca e Aquicultura**. Brasília: Ministério da Pesca e Aquicultura - MPA, 2012.
- BIRCH, E. E.; GARFIELD, S.; HOFFMAN, D. R.; UAUY, R.; BIRCH, D. G. A randomized controlled trial of early dietary supply of long-chain polyunsaturated fatty acids and mental

development in term infants. **Developmental Medicine and Child Neurology**, v.42, n.3, p.174–181, 2000.

CHEN, S. C.; LIN, Y. H.; HUANG, H. P.; HSU, W. L.; HOUNG, J. Y.; HUANG, C.K. Effect of conjugated linoleic acid supplementation on weight loss and body fat composition in a Chinese population. **Nutrition**, v. 28, p.559–565, 2012b.

CHEN, Y. J.; CHEN, C. C.; LI, T. K.; WANG, P. H.; LIU, L. R.; CHANG, F. Y.; WANG, Y. C.; YU, Y. H.; LIN, S. P.; MERSMANN, H. J. Docosaheaxaenoic acid suppresses the expression of FoxO and its target genes. **Journal Nutrition Biochemistry**, v. 23, p.1609-1616, 2012a.

CHUNG, K.; LEE, K. Removal of trimethylamine by adsorption over zeolite catalysts and deodorization of fish oil. **Journal of Hazardous Materials**, v. 172, p. 922–927, 2009.

CMOLIK, J.; POKORNY, J. Physical refining of edible oils. **European Journal of Lipid Science and Technology**, v. 102, p. 472-485, 2000.

CREXI, V. T.; GRUNENVALDT, F. L.; SOARES, L. A. S.; PINTO, L. A. A. Refino de óleos de corvina (*Micropogonias furnieri*) provenientes dos processos de ensilagem ácida e termomecânico de farinha. **Revista Instituto Adolfo Lutz**, v. 66, n. 1, p. 50-56, 2007.

CREXI, V. T.; SOUZA-SOARES, L. A.; PINTO, L. A. A. 2009. Carp (*Cyprinus carpio*) oils obtained by fishmeal and ensilage processes: characteristics and lipid profiles. **International Journal of Food Science and Technology**, v. 44, p. 1642–1648, 2009.

CUNHA, D. C.; SOUZA-SOARES, L. A.; PINTO, L. A. A. Estudo do fracionamento físico do óleo de pescado via “winterização”. **Brazilian Journal Food Technology**, v. 97, n. 5, p. 183-188, 2002.

DAUKSAS, E.; FALCH, E.; SLIZYTE, R.; RUSTAD T. Composition of fatty acids and lipid classes in bulk products generated during enzymic hydrolysis of cod (*Gadus morhua*) by-products. **Process Biochemistry**, v.40, p. 2659–2670, 2005.

DUMAY, J.; ALLERY, M.; DONNAY-MORENO, C.; BARNATHAN, G.; JAOUEN, P.; CARBONNEAU, M. E.; BERGÉ, J. P. Optimization of hydrolysis of sardine (*Sardina pilchardus*) heads with protamex: enhancement of lipid and phospholipid extraction. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 89, n. 9, p. 1599 – 1606, 2009.

DUMAY, J.; BARTHOMEUF, C.; BERGÉ, J. P. How enzymes may be helpful for upgrading fish by-products: enhancement of fat extraction. **Journal Aquatic Food Product Technology**, v. 13, p. 69–84, 2004.

DUMAY, J.; DONNAY-MORENO, C.; BARNATHAN, G.; JAOUEN, P.; BERGE, J. P. Improvement of lipid and phospholipid recoveries from sardine (*Sardina pilchardus*) viscera using industrial proteases. **Process Biochemistry**, v.41, p. 2327–2332, 2006.

DYER, W. J. Amines in fish muscle: I. Colorimetric determination of trimethylamine as the picrate salt. **Journal of the Fisheries Research Board of Canada**, v. 6, p. 351-358, 1945.

ENDO, Y.; TAGIRI-ENDO, M.; KIMURA, K. Determination of iodine and saponification values in fish oil by near-infrared spectroscopy. **Journal of Food Science**, v. 70, n. 2, p. c127-c131, 2005.

FALCH, E.; RUSTAD, T.; AURSAND, M. By-products from gadiform species as raw material for production of marine lipids as ingredients in food or feed. **Process Biochemistry**, v.41, p.666–674, 2006.

FAO. **El Estado Mundial de la Pesca y la Acuicultura**. Roma : departamento de pesca y acuicultura de la fao - organización de las naciones unidas para la alimentación y la agricultura, 2012.

FAO. **The State of World Fisheries and Aquaculture 2014: Opportunities and Challenges**, Food and Agriculture Organization of The United Nations, Rome, 2014.

FERNÁNDEZ-CABANÁS, V. M.; POLVILLO, O.; RODRÍGUEZ-ACUÑA, R.; BOTELLA, B.; HORCADA, A. Rapid determination of the fatty acid profile in pork dry-cured sausages by NIR spectroscopy. **Food Chemistry**, v. 124, p. 373–378, 2011.

FURLAN, E. F.; OETTERER, M. Hidrolisado proteico de pescado. Rev. **Ciência & Tecnologia**, v.10, n.19, p.79-89, 2002.

GBOGOURI, G. A.; LINDER, M.; FANNI, J.; PARMENTIER, M. Analysis of lipids extracted from salmon (*Salmo salar*) heads by commercial proteolytic enzymes. **European Journal Lipid Science Technology**. v. 108, p. 766–775, 2006.

GILDBERG A. Recovery of proteinases and protein hydrolysates from fish viscera. **Bioresource Technology**, v. 39, p. 271-276, 1992.

GRIMALDI, R.; TIEKO, R.; GAURALDO, L.; CAVALETTI, R. Characterization of hydrogenated fats for margarine manufacturing purposes. **Grasas Aceites**, v. 49, p. 1-8, 1998.

HATHWAR, S. C.; BIJINU, B. ; RAI, A. K.; NARAYAN, B. Simultaneous recovery of lipids and proteins by enzymatic hydrolysis of fish industry waste using different commercial proteases. **Applied Biochemistry and Biotechnology** , v.164, p.115–124, 2011.

HAZIN, F. H. V.; TRAVASSOS, P. E. A pesca oceânica no Brasil no século 21. **Revista Brasileira de Engenharia de Pesca**, v. 2, n. 1, p. 60-75, 2007.

HERPANDI, N. H.; ROSMA, A.; WAN NADIAH, W. A. The tuna fishing industry: a new outlook on fish protein hydrolysates. **Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety**, v.10, p.195-207, 2011.

HUSS, H. H. **Fresh Fish Quality and Quality Changes**. Rome, Italy : FAO, 1988.

JIANG H.; TONG, T.; SUN, J.; XU, Y.; ZHAO, Z.; LIAO, D. Purification and characterization of antioxidative peptides from round scad (*Decapterus maruadsi*) muscle protein hydrolysate. **Food Chemistry**, v.154, p.158–163, 2014.

KATO, S.; KUNISAWA, N.; KOJIMA, T.; MURAKAMI, S. Evaluation of ozone treated fish waste oil as a fuel for transportation. **Journal of Chemical Engineering of Japan**, v. 37, p. 863–870, 2004.

KECHAOU, E. S.; DUMAY, J.; DONNAY-MORENO, C.; JAOUEN, P.; GOUYGOU, J.; BERGÉ, J.; AMAR R. B. Enzymatic hydrolysis of cuttlefish (*Sepia officinalis*) and sardine (*Sardina pilchardus*) viscera using commercial proteases: Effects on lipid distribution and amino acid composition. **Journal of Bioscience and Bioengineering**. v.107, n. 2, p. 158–164, 2009.

KOTZAMANIS, Y. P.; ALEXIS, M. N.; ANDRIOPOULOU, A.; CASTRITSI-CATHARIOU, I.; FOTIS, G. Utilization of waste material resulting from trout processing in gilthead bream (*Sparus aurata* L.) Diets. **Aquaculture Research**. v. 32, n. 1, p. 288–295, 2001.

KUMAR, M. N. A review of chitin and chitosan applications. **Reactive and Functional Polymers**. v. 45, p. 1–27. 2000.

KUROZAWA, L. E.; PARK, K. J.; HUBINGER, M. D. Influência das condições de processo na cinética de hidrólise enzimática de carne de frango. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, V.29, N.3, P.557-566, 2009.

LAOHAKUNJIT, N.; SELAMASSAKUL, O.; KERDCHOECHUEN, O.; Seafood-like flavour obtained from the enzymatic hydrolysis of the protein by-products of seaweed (*Gracilaria* sp.) **Food Chemistry**, v. 158, p. 162–170, 2014.

LAPLANTE, S.; SOUCHET, N.; BRYL, P. Comparison of low-temperature processes for oil and coenzyme q10 extraction from mackerel and herring. **European Journal Lipid Science Technology**, v. 111, p. 135–141. 2009.

LEE, C. F. Processing fish meal and oil. In: STANSBY, E. M. **Industrial Fishery Technology**. New York : Reinhold Publishing Corporation, v.16, p. 219-235, 1963.

LEE, J.; O'KEEFE, J.; LAVIE, C.; MARCHIOLI, R.; HARRIS, W. Omega-3 fatty acids for cardioprotection. **Mayo Clinic Proceedings**, v. 83, p. 324-332. 2008.

LIN, C. F.; HSIEH, T. C. Y.; CROWTHER, J. B.; BIMBO, A. P. Efficiency of removing volatiles from Menhaden oils by refining, bleaching and deodorization. **Journal of Food Science**, v. 55, p. 1669– 1972, 1990.

LINDER, M.; FANNI, J.; PARMENTIER, M. Proteolytic extraction of salmon oil and PUFA concentration by lipases. **Mar Biotechnology**. v. 15, p. 70–76, 2005.

LIU, Y.; LI, X.; CHEN Z.; YU, J.; WANG, F.; WANG, J. Characterization of structural and functional properties of fish protein hydrolysates from surimi processing by-products. **Food Chemistry**, v. 151, p. 459–465, 2014.

LÓPEZ-MARTÍNEZ, J. C.; CAMPRA-MADRID, P.; GUIL-GUERRERO, J. L. Alpha linolenic acid enrichment from borago officinalis and echium fastuosum seed oils and fatty

acids by low temperature crystallization. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v. 97, n. 5, p. 294–298, 2004.

LUNN, J.; THEOBALD, H. E. The health effects of dietary unsaturated fatty acids. **Nutrition Bulletin**, v.31, p. 178–224, 2006.

MOLKENTIN, J.; LEHMANN, I.; OSTERMEYER, U.; REHBEIN, H. Traceability of organic fish e Authenticating the production origin of salmonids by chemical and isotopic analyses. **Food Control**, v. 53, p.55-66, 2015.

MORAIS, M. M.; PINTO, L. A. A.; ORTIZ, S. C. A.; CREXI, V. T.; SILVA, R. L.; SILVA, J. D. Estudo do processo de refino do óleo de pescado. **Revista Instituto Adolfo Lutz**. v. 60, n.1, p. 23-33, 2001.

MOSQUERA, M.; GIMÉNEZ, B.; SILVA, I. M.; BOELTER, J. F.; MONTERO, P.; GÓMEZ-GUILLÉN, M. C.; BRANDELLI, A. Nanoencapsulation of an active peptidic fraction from sea bream scales collagen. **Food Chemistry**, v. 156, p.144–150, 2014.

NAGAI, T.; SUZUKI, N. Isolation of collagen from fish waste material – skin, bone and fin. **Food Chemistry**, v. 68, p. 277–281, 2000.

NAVARRO, C.; FERNANDEZ-LOPEZ, J. Quality characteristics of dark muscle from yellowfin tuna *Thunnus albacares* to its potential application in the food industry. **Food and Nutrition Sciences**, v.2, p.22-30, 2011.

NAYLOR, R. L., HARDY, R. W., BUREAU, D. P., CHIU, A., ELLIOTT, M., FARRELL, A. P. Feeding aquaculture in an era of finite resources. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v.106, p.15103-15110, 2009.

NGUYEN, H. T. M. Y.; SYLLA, K. S. B.; RANDRIAMAHATODY, Z.; DONNAY-MORENO, C.; MOREAU, J.; TRAN, L. T.; BERGÉ, J. P. Enzymatic hydrolysis of yellowfin tuna (*Thunnus albacares*) by-products using protamex protease. **Food Technology and Biotechnology**, v. 49, p. 48-55, 2011.

OETTERER, M. Produção de silagem a partir da biomassa residual de pescado. **Alimentos e Nutrição**, v. 5, p. 119-134, 1994.

OETTERER, M. **Produtos Obtidos por Interferência na Fração Proteica do Pescado**. Piracicaba: ESALQ, 2001.

OGAWA, M., & MAIA, E. L. **Manual of Fisheries**. São Paulo: Varela. 1999.

OLIVEIRA, A. C. M.; MILLER, M. R. Purification of Alaskan Walleye Pollock (*Gadus chalcogrammus*) and New Zealand Hoki (*Macruronus novaezelandiae*) Liver Oil Using Short Path Distillation. **Nutrients**, v. 6, p. 2059-2076, 2014.

OLSEN, R. L.; TOPPE, J. KARUNASAGAR I. Challenges and realistic opportunities in the use of by-products from processing of fish and shellfish. **Trends in Food Science & Technology**. v.36, p.144-151, 2014.

PIGOTT, G. M.; TUCKER, B. W. Science opens new horizons for marine lipids in human nutrition. **Food Reviews International**, v. 3, n. 1-2, p. 105-138, 1987.

RAI, A. K.; BHASKAR, N.; BASKARAN, V. Bioefficacy of EPA–DHA from lipids recovered from fish processing wastes through biotechnological approaches. **Food Chemistry**, v.136, p.80–86, 2013.

RITTNER, H. **Óleo de Palma: Processamento e Utilização**. 1ª ed. São Paulo: s.n., 1996.

ROMAN, J. A.; SGARBIERI, V. C. Efeito da hidrólise enzimática sobre propriedades funcionais de caseína bovina coagulada pela ação da quimosina. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v.25, n.3, p. 468-474, 2005.

RUBIO-RODRÍGUEZ, N.; DIEGO, S. M.; BELTRÁN, S.; JAIME, I.; SANZ, M. T.; ROVIRA, J. Supercritical fluid extraction of fish oil from fish by-products: A comparison with other extraction methods. **Journal of Food Engineering**, v.109, p.238–248, 2012.

RUSTAD, T. Utilisation of marine by-products. **Electronic Journal Environmental Agricultural and Food Chemistry**, p. 458-463, 2003.

SACHINDRA, N. M.; BHASKAR, N.; MAHENDRAKAR, N. S. Recovery of carotenoids from shrimp waste in organic solvents. **Waste Management**, v. 26, p. 1092–1098, 2006.

SALAS, A.; CHAVEZ, J.; CUETO, M.; AYALA, M. E. Estabilizacion de aceite de pescado destinado la alimentacion humana. **Boletin de Investigación Instituto Tecnológico Pesquero de Peru**, v. 5, p. 73-80, 2003.

SÁNCHEZ-ZAPATA, E.; AMENSOUR, M.; OLIVER, R.; FUENTES-ZARAGOZA, E.; SANHUEZA, J.; NIETO, S.; VALENZUELA, A. Acido docosahexaenoico (DHA), desarrollo cerebral, memoria y aprendizaje. **Revista Chilena de Nutrición**, v. 31, p. 84-92, 2004.

SAN GIOVANNI, J. P.; CHEW, E. Y. The role of omega-3 long-chain polyunsaturated fatty acids in health and disease of the retina. **Progress in Retinal and Eye Research**, v. 24, n.1, p. 87–138, 2005.

SHAHIDI, F. **Maximizing the Value of Marine by-Products**. CRC Press, Boca Ratón (USA), 2007.

SHAHIDI, F.; METUSALACH, G.; BROWN, J. A. Carotenoid pigments in seafoods and aquaculture. **Critical Reviews in Food Science**, v. 38, p. 1–67, 1998.

SILVA, V. D. M.; SILVESTRE, M. P. C. Functional properties of bovine blood plasma intended for use as a functional ingredient in human food. **LWT - Food Science and Technology**, v. 36, n. 7, p. 709–718, 2003.

SLIZYTE, R.; RUSTAD, T.; STORRØ, I. Enzymatic hydrolysis of cod (*Gadus morhua*) by-products – optimization of yield and properties of lipid and protein fractions. **Process Biochemistry**, v. 40, p. 3680–3692, 2005.

SULTANBAWA, Y.; AKSNES, A. Tuna process waste e an unexploited resource. **INFOFISH International**. v.3, p.37-40, 2006.

TAVARES, J. F. P.; BAPTISTA, J. A. B.; MARCONE, M. F. Milkcoagulating enzymes of tuna fish waste as a rennet substitute. **International Journal of Food Science and Nutrition**, v. 48, p. 169–176, 1997.

VAISALI, C.; CHARANYAA, S.; BELUR, D. P.; REGUPATHI, I. Refining of edible oils: a critical appraisal of current and potential Technologies. **International Journal of Food Science and Technology**, v.50, p.13–23, 2015.

VALENZUELA, A.; UAUY, R. Consumption pattern of dietary fats in chile. N-6 and n-3 fatty acids. **International Food Science Nutrition**, v. 50, p. 127-133, 1999.

VALENZUELA, A. B.; NIETO, S. K. Ácidos grasos omega-6 y omega- 3 en la nutrición perinatal: su importância em el desarrollo del sistema nervioso y visual. **Revista Chilena de Pediatría**, v.74, p.149-57, 2003.

VALENZUELA, A.; SANHUEZA, J.; BARRA, F. L. El aceite de pescado: ayer un desecho industrial, hoy un producto de alto valor nutricional. **Revista Chilena Nutrición**, v. 39, n. 2, p. 201-209, 2012.

VIEGAS, E. M. M. **Elaboração e caracterização de hidrolisados protéicos de peixe e sua utilização na nutrição de organismos aquáticos**. Jaboticabal: UNESP, 2000.

WANG, Q.; LI, W.; HE, Y.; REN, D.; KOW, F.; SONG, L.; YU X. Novel antioxidative peptides from the protein hydrolysate of oysters (*Crassostrea talienwhanensis*). **Food Chemistry**, v.145, p. 991–996, 2014.

XIAO, L. M. S. A.; HAUGSGJERD, B. O. Efficiencies of three common lipid extraction methods evaluated by calculating mass balances of the fatty acids. **Journal of Food Composition and Analysis**, v. 25, p. 198–207, 2012.

ZAVAREZE, E. R.; SILVA, C. M.; SALAS-MELLADO, M.; PRENTICE-HERNÁNDEZ, C. Funcionalidade de hidrolisados protéicos de cabrinha (*Prionotus punctatus*) obtidos a partir de diferentes proteases microbianas. **Química Nova**, v.32, n.7, p.1739-1743, 2009.

ZHANG, N.; YAMASHITA, Y.; NOZAKI, Y. Effect of protein hydrolysate from antarctic krill meat on the state of water and denaturation by dehydration of lizard fish myofibrils. **Fisheries Science**, v. 68, p. 672–679, 2002.

CAPÍTULO 2 – EXTRAÇÃO DO ÓLEO DE CABEÇAS DE ATUM (*Thunnus albacares*) PELO MÉTODO ALTERNATIVO VIA HIDRÓLISE ENZIMÁTICA

EXTRAÇÃO DO ÓLEO DE CABEÇAS DE ATUM (*Thunnus albacares*) PELO MÉTODO ALTERNATIVO VIA HIDRÓLISE ENZIMÁTICA

1 RESUMO

A fim de agregar valor aos coprodutos gerados no processamento de atum que são normalmente descartados por não haver políticas de recuperação ou reaproveitamento, foi estudada a ação da Alcalase na produção de peptídeos antioxidantes da cabeça de atum (*Thunnus albacares*) e na recuperação de ácidos graxos poli-insaturados. O hidrolisado proteico de cabeças de atum (HPA) foi obtido com a utilização da enzima Alcalase (0,2 % de enzima em relação ao substrato), a 60 °C, pH 6,5, por 120 min, apresentou 71,57 % de umidade, 10,39 % de proteínas, 2,55 % de lipídeos, 7,93 % de cinzas e grau de hidrólise, determinada pelo método de OPA (o-ftaldeído), de 9,24 %. A capacidade antioxidante do HPA foi determinada pelos métodos oxygen radical absorbance capacity (ORAC), ferric reducing antioxidant power (FRAP) and Trolox equivalent antioxidant capacity (TEAC). O HPA apresentou valor de FRAP de 54,31 $\mu\text{M TE/g}$, semelhante ao valor de TEAC e inferior a ORAC. Esses dados sugerem que o mecanismo predominante pelo qual estes peptídeos atuam como antioxidantes é por transferência de um átomo de hidrogênio e não por elétrons. O perfil de ácidos graxos do óleo recuperado do HPA por centrifugação, determinado pelo cromatógrafo a gás equipado, foi caracterizado por um elevado percentual de ácidos graxos poli-insaturados (AGPI) (39,06 %), representados principalmente pelos ácidos graxos $\omega 3$ DHA e EPA.

Palavras-chave: Perfil de aminoácidos, hidrólise enzimática, coproduto, capacidade de absorção do radical oxigênio

EXTRACTION OF TUNA (*Thunnus albacares*) HEADS OIL FOR ALTERNATIVE METHOD VIA HYDROLYSIS ENZYMATIC.

2 ABSTRACT

The action of alcalase in the production of antioxidant peptides in tuna (*Thunnus albacares*) head and the recovery of unsaturated fatty acids was assessed in order to add value to by-products generated in the processing of this fish, which are normally discarded due to lack of recovery or reuse policies. The tuna protein hydrolysate (TPH) obtained through the enzymatic action of alcalase (enzyme to substrate ratio 1: 200 w/w) under the conditions of 60 °C, pH 6.5 and 120 minutes, resulted in 71.57 % of moisture, 10.39 % of protein, 2.55 % of lipid, 7.93 % of ash and degree of hydrolysis - determined by the o-phthalaldehyde method - of 9.24 %. The antioxidant capacity of TPH was determined by the methods of oxygen radical absorbance capacity (ORAC), ferric reducing antioxidant power (FRAP) and Trolox equivalent antioxidant capacity (TEAC), resulting in 54.31 µM TE/g according to FRAP, value similar to TEAC but lower than ORAC. These data suggest that the charge transfer of H^+ is the predominant mechanism by which these peptides act as antioxidants instead of electrons transfer. The fatty acid profile of the oil recovered by centrifugation of the TPH - as determined by a gas chromatograph was characterized by a high percentage of polyunsaturated fatty acids (PUFA) (39.06 %), mainly represented by the fatty acids $\omega 3$, docosahexaenoic and eicosapentaenoic.

Keywords: amino acid profile, enzymatic hydrolysis, by-products, oxygen radical absorbance capacity.

3 INTRODUÇÃO

O estresse oxidativo decorre da existência de um desequilíbrio entre compostos oxidantes e antioxidantes, em favor da geração excessiva de radicais livres ou em detrimento da velocidade de remoção desses. Tal processo conduz à oxidação de biomoléculas com consequente perda de suas funções biológicas, cuja manifestação é o dano oxidativo potencial contra células e tecidos e, por isso, está envolvido na patogênese de diversas doenças como câncer, diabetes, obesidade e doenças cardiovasculares e neurodegenerativas (HALLIWELL; WHITEMAN, 2004; VALTUEÑA *et al.*, 2008).

Estudos recentes têm associado a redução do risco dessas doenças com uma alimentação balanceada e rica em frutas, vegetais e cereais integrais, por ser fonte de compostos antioxidantes. Estes compostos, como as vitaminas C e E e os polifenóis, atuam junto ao sistema de defesa antioxidante, neutralizando os radicais livres e/ou espécies reativas e minimizando os efeitos deletérios provocados pela oxidação das biomoléculas (VALTUEÑA *et al.*, 2008; BALASUNDRAM; SUNDRAM; SAMMAN, 2006; NACZK; SHAHIDI, 2006). Paralelamente, no alimento, os radicais livres também podem oxidar outros nutrientes, provocando efeitos não desejáveis como redução da útil, rancidez oxidativa e perda da qualidade sensorial e nutricional do produto. Assim, a busca por novas formas de extração, identificação e aplicação de antioxidantes de origem animal e vegetal têm se intensificado, visando o uso como ingrediente funcional ou como substitutos aos antioxidantes sintéticos (BERGER *et al.*, 2011).

Uma das alternativas que tem sido bastante estudada é a obtenção de peptídeos antioxidantes por meio da hidrólise enzimática de proteínas nativas (SHAHIDI; ZHONG, 2010; ERDMANN; CHEUNG; SCHRÖDE, 2008; ELIAS; KELLERBY; DECKE, 2008; HARNEDY; FITZGERALD, 2012; SAMARANAYAKA; LI-CHAN, 2011). A hidrólise enzimática pode ocorrer *in vivo*, por ação de enzimas do trato digestivo e/ou por enzimas da microbiota intestinal, e *in vitro*, por ação de enzimas isoladas de microrganismos (MÖLLER *et al.*, 2008). Na proteína, ela promove a liberação de peptídeos que estão no interior da molécula, facilitando a sua ação contra os agentes oxidantes (ORSINI; TIRONI; AÑÓN, 2011).

Hidrolisados proteicos de organismos marinhos são fontes abundantes de peptídeos antioxidantes (KIM; WIJESEKARA, 2010; YANG *et al.*, 2011; KLOMPONG *et al.*, 2008). Na indústria pesqueira, o processamento de atum gera um coproduto composto por cabeça, cauda, vísceras, músculo escuro, abas e ventre, que podem corresponder a até 70 % da

matéria-prima original (SAIDI, *et al.*, 2014; NGUYEN *et al.*, 2011). Este coproduto é normalmente descartado por falta de tecnologias viáveis de valorização e aproveitamento, ou por não haver políticas de recuperação (SAIDI, *et al.*, 2014). Uma das formas de agregar valor a esses é a hidrólise enzimática que, além de favorecer a formação de peptídeos com propriedades nutricionais e funcionais, como os peptídeos antioxidantes, pode ser utilizada para recuperar lipídeos, proporcionando maior rentabilidade à indústria pesqueira (DAUKŠAS *et al.*, 2005; BATISTA *et al.*, 2010; HATHWAR *et al.*, 2011).

Dessa forma, este capítulo teve como objetivo estudar a ação da Alcalase na produção de peptídeos antioxidantes de coproduto (cabeças) de atum (*Thunnus albacares*) e na recuperação de óleo rico em ácidos graxos poli-insaturados.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 MATERIAL

As cabeças de atum (*Thunnus albacares*), congeladas e acondicionadas em embalagem de ráfia, foram gentilmente cedidas pela empresa Fishes Brazil (Espírito Santo, Brasil). O pescado foi identificado como sendo proveniente da costa Espírito Santense. A Alcalase 2.4L® foi obtida da Novozymes Latino Americana Ltda (Paraná, Brasil). Os reagentes Trolox (6-Hidroxi-2,5,7,8 tetrametilchroman-2-ácido carboxílico), TPTZ (2,4,6-Tris(2-piridil)-s-triazina), AAPH (2,2'azobis (2-amidino-propano) dihidroclorido), ABTS (2,2 AZINO BIS (3-ethylbenzo thiazoline 6 sulfonic acid) diammoninum salt) e demais reagentes de grau analítico foram adquiridos da Sigma (St. Louis, MO, USA).

4.2 PRODUÇÃO INDUSTRIAL DO HIDROLISADO DE CABEÇAS DE ATUM

O hidrolisado proteico de cabeça de atum (*Thunnus albacares*) (HPA) foi obtido conforme a metodologia descrita por Dieterich *et al.* (2014). As cabeças foram descongeladas e trituradas (5,0 mm) para a obtenção de massa homogênea. A hidrólise enzimática foi realizada em reator industrial de aço inox encamisado com capacidade total para duas toneladas e aquecimento elétrico com controle de temperatura e agitação constante. A hidrólise foi realizada com a enzima Alcalase (0,2 % de enzima em relação ao substrato), a 60 °C, pH 6,5, por 120 min. A porcentagem de água em relação ao substrato foi de 30 %. Ao término da hidrólise, a enzima foi inativada a 85°C durante 15 min. O hidrolisado foi filtrado em peneira de aço inox (1,0 mm) para a retirada dos ossos e espinhas.

Para a recuperação do óleo, o hidrolisado foi submetido à centrifugação (HERMLE - 78564 Wehingen - Germany) contínua a 4427 x g (6000 RPM), o produto resultante incluía três frações: uma camada aquosa de fundo, uma camada de emulsão no meio, e a parte superior, camada de óleo. A fração de óleo foi separada das outras frações, armazenada em um frasco âmbar e mantida congelada a – 20 °C até o momento das análises.

4.3 COMPOSIÇÃO FÍSICO-QUÍMICA

O hidrolisado de cabeças de atum (*Thunnus albacares*) foi analisado quanto ao conteúdo total de lipídeo pela metodologia de extração por Soxhlet com éter de petróleo (método 920.39) (AOAC, 1995). O teor de proteína foi determinado pelo Método de Kjeldahl

(% nitrogen x 6,25) (método 991.20) (AOAC, 1995). A umidade foi obtida após secagem a 105 °C até a massa constante (método 930.15) (AOAC, 1995) e o teor de cinzas (método 900.02) determinado após calcinação das amostras *overnight* a 550 °C (AOAC, 1996). O conteúdo de carboidratos foi obtido por diferença.

O rendimento do óleo recuperado pela hidrólise proteica de atum foi determinado em percentual do teor de lipídeos totais na matéria-prima, obtidos pela metodologia padrão (Soxhlet):

Rendimento (%) = (Volume do óleo recuperado/total de lipídeos) x 100
(HATHWAR *et al.*, 2011).

4.4 GRAU DE HIDRÓLISE

O grau de hidrólise (GH %), que está associado com o número de ligações peptídicas clivadas (BATISTA, 2011), foi calculado pelo método de o-ftaldeído (OPA) primeiramente descrito por Church *et al.* (1983) e modificado por Nielsen; Petersen; Dambrmann (2001). Este método baseia-se na reação de grupos amino primários com o reagente de OPA. O produto da reação foi lido a 340 nm em espectrofotômetro utilizando-se a serina como padrão.

4.5 CAPACIDADE ANTIOXIDANTE

A capacidade antioxidante, que está relacionada com a capacidade de uma substância atrasar ou inibir a oxidação de um substrato de maneira eficaz (MOREIRA; SHAMI, 2004), foi determinada em extratos aquosos por métodos *Ferric Reducing Antioxidant Power* (FRAP), *Oxygen Radical Absorbance Capacity* (ORAC) e *Trolox Equivalent Antioxidant Capacity* (TEAC). Para obter os extratos aquosos, as amostras foram suspensas em água deionizada (1 % m/v). Os extratos foram agitados durante 30 min, centrifugados em RC5C (Sorvall Instruments Dupont, Wilmington, EUA) em 35,735 x g durante 30 min. a 10 °C, filtrados através de papel filtro Whatman n°1 e armazenado a -20 °C e protegido da luz, até serem utilizadas.

Ferric reducing antioxidant power (FRAP): o ensaio de FRAP foi realizado de acordo com Benzie & Estirpe (1996), com as seguintes modificações: em ambiente escuro (sem incidência direta da luz sobre a amostra), 30 µL de extrato da amostra foi misturado com 90 mL de água e 900 µL do reagente FRAP (450 mL de tampão acetato 0,3 M, pH 3,6; 225 µL de 10 mmol de TPTZ (2,4,6-Tris(2-piridil)-s-triazina) em 40 mmol de HCl e 225 µL de 20

mmol de FeCl_3). A mistura foi incubada a 30 °C durante 30 min. A absorbância foi lida a 595 nm em um leitor de microplacas Synergy™ HT Multi-Mode (Biotek®, Vermont, EUA). Trolox (6-Hidroxi-2,5,7,8-tetrametilchroman-2-ácido carboxílico) foi usado como padrão e os resultados foram expressos em μmol de Trolox equivalente (TE) por grama de amostra. Os ensaios foram realizados em triplicata.

Oxygen Radical Absorbance Capacity (ORAC): o teste ORAC foi realizado de acordo com Dávalos *et al.* (2004). Assim, 20 μL de extrato e 120 μL de fluoresceína de sódio foram adicionados a um tampão de fosfato de potássio (pH 7,4) a uma concentração final de 0,378 $\mu\text{g} / \text{mL}$ e 60 μL de AAPH (2,2'-azo-bis (2-methylpropionamidine) dicloridrato) em água (concentração final: 108 mg / mL). Tampão de fosfato de potássio foi usado como um branco. Soluções Trolox (25-500 mM) foram usadas como padrão. A fluorescência foi medida a cada minuto, durante 80 minutos usando um leitor de microplacas Synergy™ HT Multi-Modo com um comprimento de onda de excitação de 485 nm e um comprimento de onda de emissão de 520 nm. A capacidade antioxidante foi expressa como μmol de Trolox equivalente (TE) por grama e baseou-se na *area under the curve* (AUC) para a diminuição do tempo de fluorescência.

Trolox equivalent antioxidant capacity (TEAC): o ensaio de TEAC foi realizado de acordo com Re *et al.*, (1999). A solução do radical ABTS (2,2'-AZINO BIS (3-ethylbenzo thiazoline 6 sulfonic acid) diammonium salt) foi preparada a partir da reação de 5 mL da solução estoque de ABTS 7mM com 88 μL da solução de persulfato de potássio 140 mM. A mistura foi, então, mantida em ambiente escuro, à temperatura ambiente, por 16 h. Em seguida, diluiu-se 1 mL desta mistura em 30 mL álcool etílico. Adicionou-se 15 μL de extrato das amostras em 1,5 mL da solução de radical ABTS, e após 6 minutos foi realizada leitura de absorbância em 734 nm em leitor de microplaca Synergy™ HT Multi-Mode (BioTek®, Vermont, EUA). Para o branco, a amostra foi substituída pelo solvente utilizado no extrato. A atividade antioxidante foi, então, determinada em μM de equivalente de trolox (TE)/g amostra. Para a determinação da atividade antioxidante das amostras foi construída uma curva padrão de Trolox, nas concentrações de 100, 500, 1000, 1500 e 2000 μM . Os resultados foram expressos em μM TE/ g amostra. As determinações foram feitas em triplicatas.

4.6 PERFIL DE AMINOÁCIDOS TOTAIS E LIVRES

Aminoácidos totais e livres foram determinados por cromatografia líquida de fase reversa (RP – HPLC) usando um sistema de HPLC (Thermo Fisher Scientific Inc, MA USA)

equipado com detector UV a 254 nm (UV SPECTRA SYSTEM UV 2000). Para os aminoácidos totais, foi utilizada a coluna LUNA C18, 100Å, 5µ, 250 x 4,6 mm e para as determinações de aminoácidos livres foi utilizada a coluna Pico-Tag Column, 60Å, 4 µm, 3,9 mm X 300 mm, 1/pkg. A quantificação dos aminoácidos foi realizada seguindo o método descrito por White, Hard e Fry (1986) e Hagen, Fost e Augustin (1989).

4.7 DETERMINAÇÃO DO PERFIL DE ÁCIDOS GRAXOS

Previamente à realização das análises cromatográficas, as amostras foram submetidas ao método de metilação/derivatização, descrito por O'Fallon *et. al.* (2007). Em um tubo de ensaio com rosca, foram adicionadas a amostra de óleo 40 µL e 5,3 mL de metanol, e o conteúdo foi submetido à agitação. O frasco foi então incubado a 55°C em banho-maria por 1h30min, tendo sido feita uma agitação vigorosa durante 5 segundos a cada 20 minutos, para permear corretamente, dissolver e hidrolisar a amostra. Em seguida, o conteúdo foi resfriado à temperatura ambiente em um banho de água fria, e adicionaram-se 580 µL de ácido sulfúrico (K₂SO₄) 12 mol/L. O conteúdo foi misturado por inversão, tendo sido observada a formação de um precipitado de K₂SO₄. O conteúdo foi novamente incubado em banho-maria a 55°C por 1h30min, com agitação por 5 segundos a cada 20 min. Após a síntese, a mistura foi resfriada em um banho de água fria, adicionando-se, então, 3 mL de hexano e agitando-se em vórtex. O tubo foi centrifugado por 5 minutos e o sobrenadante transferido para um *vial* de cromatografia em fase gasosa (CG). Quando necessário, o excesso de solvente foi evaporado com nitrogênio. A amostra foi armazenada a -20°C até a análise.

O perfil de ácidos graxos foi determinado por cromatografia a gás, pelo método Ce 1-62 da (AOCS, 2003). Foi utilizado cromatógrafo a gás, Shimadzu-2010, equipado com coluna capilar HP 88, dimensões 100 m de comprimento, diâmetro interno de 0,25 mm, 0,20 µm de espessura do filme. Condições de operação: *split* = 1:150; fluxo da coluna = 0,92 mL/min.; temperatura do detector: 260 °C; temperatura do injetor: 150 °C; temperatura do forno: 140 °C – 6 min, 140 °C – 240 °C (4 °C/min), 240 °C – 6 min; gás auxiliar (“*makeupgas*”): nitrogênio; gás de arraste: hélio; volume injetado: 1,0 µL.

Os AG foram identificados por comparação com os tempos de retenção do padrão cromatográfico de C4:0 a C24:0 (SupelcoTM37 Componente FAME Mix, 100 mg Neat) e as concentrações expressas em percentagem.

4.8 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os dados foram apresentados, em média, com o desvio padrão. Análise de variância ANOVA e teste de Tukey ao nível de 5 % foram realizados com o software STATISTICA 7.0 (Statsoft, Tulsa, USA).

5 RESULTADOS E DISCUSSÕES

5.1 CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA DO HIDROLISADO PROTEICO DE CABEÇA DE ATUM

No presente estudo, o hidrolisado proteico de cabeça de atum (*Thunnus albacares*) apresentou 71,57 % de umidade, 10,39 % de proteínas, 2,55 % de lipídeos, 7,93 % de cinzas e grau de hidrólise (GH) de 9,24 %. Valores semelhantes de grau de hidrólise com Alcalase foram encontrados em hidrolisados proteicos de cabeças e vísceras de sardinha (*Sardinella aurita*) (8 %) (BOUGATEF *et al.*, 2010) e de músculo de salmão (*Salmo salar*) (5 %) (KRISTINSSON; RASCO, 2000a).

Valores diferentes de grau de hidrólise podem ser observados, como resultado do pH, tempo de reação e proporção do substrato/enzima utilizado durante a hidrólise e a composição de aminoácidos da proteína, que pode fornecer diferentes quantidades de sítios de ação de clivagem da enzima. O grau de hidrólise afeta o tamanho e, conseqüentemente, a composição de aminoácidos dos peptídeos. Em hidrolisados proteicos com alto percentual de grau de hidrólise, o gosto pode ser influenciado pela produção de peptídeos amargos. Mudança na composição de aminoácidos afetados pelo grau de hidrólise também pode modular a atividade biológica dos peptídeos formados durante a hidrólise (KRISTINSSON; RASCO, 2000^a; JAMDAR *et al.*, 2010).

5.2 EFEITO DA ALCALASE NA FRAÇÃO PROTÉICA DA CABEÇA DE ATUM

Sabe-se que a Alcalase atua como uma endopeptidase, clivando ligações peptídicas no interior da cadeia polipeptídica, produzindo assim pequenos e médios oligopeptídeos ou polipeptídeos – alguns dos quais antioxidantes (LIU *et al.*, 2010). A atividade antioxidante de hidrolisados de proteínas depende das proteases e das condições de hidrólise empregadas (PEÑA-RAMOS; XIONG; ARTEAGA, 2004; JAO; KO, 2002; JUN *et al.*, 2004).

Durante a hidrólise, uma grande variedade de peptídeos menores e aminoácidos livres são gerados, de acordo com a especificidade da enzima. Peptídeos de diferentes tamanhos e/ou compostos por várias sequências de aminoácidos podem ter diferentes modos de atuação e pode afetar a atividade antioxidante (WU; CHEN; SHIAU, 2003; WU; CHEN; SHIAU, 2003; NALINANON *et al.*, 2011).

5.2.1 Capacidade antioxidante

A fim de estudar o potencial antioxidante do hidrolisado proteico de cabeça de atum (*Thunnus albacares*) por diferentes mecanismos e condições de reação, foram utilizados três ensaios para determinação da capacidade antioxidante. Esses ensaios se baseiam em reações de transferência de um átomo de hidrogênio, como o método de *Oxygen Radical Absorbance Capacity* (ORAC) ou em reações de transferência de elétrons como os métodos *Trolox equivalent antioxidant capacity* (TEAC) e *Ferric reducing antioxidant power* (FRAP) (HUANG; OU; PRIOR, 2005). A capacidade antioxidante do hidrolisado proteico de cabeça de atum determinada pelos métodos FRAP, TEAC e ORAC está apresentada na TABELA 1.

TABELA 1 - CAPACIDADE ANTIOXIDANTE DO HIDROLISADO PROTEICO DE CABEÇA DE ATUM (HPA)

| Método de determinação | Atividade antioxidante em ($\mu\text{M TE}^{**}/\text{g}$ de proteína) |
|------------------------|--|
| *ORAC | 576,15 \pm 1,77 |
| TEAC | 52,42 \pm 3,89 |
| FRAP | 54,31 \pm 0,33 |

* *Oxygen Radical Absorbance Capacity* - ORAC; *Ferric reducing antioxidant power* - FRAP; *Trolox equivalent antioxidant capacity* – TEAC; ** Equivalente de trolox – TE.

O valor de *Oxygen Radical Absorbance Capacity* (ORAC) para o hidrolisado proteico de cabeça de atum foi considerado alto, atingindo 576,15 $\mu\text{M TE}/\text{g}$ de proteína. Este resultado corrobora os dados da literatura como aqueles apresentados por Girgih *et al.* (2015). No entanto, é inferior ao valor encontrado por Girgih *et al.* (2013) que ao determinarem a capacidade antioxidante de hidrolisado proteico de salmão (*Salmo salar*) e de suas frações por *Oxygen Radical Absorbance Capacity* (ORAC) encontraram 819,3 $\mu\text{M TE}/\text{g}$ de proteína. Contudo, considerando o alto custo de obtenção de peptídeos fracionados para uso como ingredientes funcionais, o hidrolisado não fracionado pode ser uma melhor alternativa de uso como ingrediente na formulação de alimentos antioxidantes (GIRGIH *et al.*, 2015).

A capacidade antioxidante do hidrolisado proteico de cabeça de atum, determinada por *Trolox Equivalent Antioxidant Capacity* (TEAC) e *Ferric Reducing Antioxidant Power* (FRAP), foram próximos (52,42 $\mu\text{M TE/g}$ e 54,31 $\mu\text{M TE/g}$ de proteína, respectivamente), porém bem inferior quando comparada ao valor de capacidade antioxidante obtido pelo método de *Oxygen Radical Absorbance Capacity* (576,15 $\mu\text{M TE/g}$ de proteína) (TABELA 1). Esses dados sugerem que o mecanismo predominante no qual estes peptídeos atuam como antioxidantes são por transferência de H^+ e não por elétrons. Além disso, elevados valores obtidos a partir de *Oxygen Radical Absorbance Capacity* podem indicar que estes peptídeos sejam bons antioxidantes *in vivo*, uma vez que este método é o que mais se aproxima das condições de oxirredução que ocorrem em meio fisiológico (MAGALHÃES *et al.*, 2008).

5.2.2 Perfil de aminoácidos Totais e Livres

O perfil total de aminoácidos do hidrolisado proteico de cabeça de atum e a análise de aminoácidos livres são apresentados na TABELA 2.

TABELA 2 – COMPOSIÇÃO DE AMINOÁCIDOS TOTAIS E LIVRES DO HIDROLISADO PROTEICO DE CABEÇA DE ATUM (HPA)

| Aminoácidos | Aminoácidos Totais (mg/100g de HPA) | Aminoácidos Livres (mg/100g de HPA) | FAO/WHO (2007) ¹ (mg/100g de proteína) |
|-----------------------------|--|--|--|
| Histidina | 440 | 394 | 15 |
| Isoleucina | 490 | 438,2 | 30 |
| Leucina | 850 | 1394,4 | 59 |
| Lisina | 910 | 314,2 | 45 |
| Metionina | 320 | 425 | 16 |
| Cisteína | 170 | 397 | 6 |
| Fenilalanina + tirosina | 880 | 1190,2 | 38 |
| Treonina | 490 | 384,4 | 23 |
| Triptofano | - | 15,3 | 6 |
| Valina | 680 | 479,6 | 39 |
| ∑ aminoácidos essenciais | 5230 | 5432,3 | 277 |
| Aspartato | 1000 | 385,3 | |
| Glutamato | 1333 | 452,3 | |
| Serina | 430 | 282,8 | |
| Glicina | 980 | 249,9 | |
| Taurina | 90 | 43,5 | |
| Arginina | 620 | 150,2 | |
| Alanina | 830 | 827,2 | |
| Prolina | 640 | 138,8 | |
| Ornitina | - | 179,7 | |
| Hidroxiprolina | - | 2,3 | |
| Asparagina | - | 24 | |

1FAO/WHO. Food and Agriculture Organization and World Health Organization (2007) protein and amino acid requirements in human nutrition: report of a joint FAO/WHO/UNU expert consultation. WHO technical report series 935, Geneve.

O perfil total de aminoácidos do hidrolisado proteico de cabeça de atum mostra que 50,8 % são hidrofóbicos, destes 42,9 % são compostos alifáticos e 7,9 % são aromáticos, sendo possivelmente os que mais contribuíram para a formação de peptídeos antioxidantes. Apesar de sua relação estrutura-atividade antioxidante ainda não estar estabelecida, estudos sugerem que o tipo, a posição e o grau de hidrofobicidade dos aminoácidos presentes parecem exercer um papel essencial sobre a atividade antioxidante (HARNEDY e FITZGERALD,

2012). Por exemplo, a presença de um ou mais resíduos de prolina, metionina, valina, tirosina, triptofano e fenilalanina pode aumentar a atividade antioxidante dos peptídeos (REN *et al.*, 2008; YOU *et al.*, 2010). Segundo Ranathunga *et al.* (2006) resíduos hidrofóbicos, como valina ou leucina facilitam a interação de peptídeos na interface óleo-água, facilitando a eliminação de radicais livres na fase lipídica.

A análise de aminoácidos livres revelou que a leucina (17,1 %) foi o aminoácido encontrado em maior quantidade. Também houve predominância em ordem decrescente dos aminoácidos, de fenilalanina + tirosina, alanina, valina, glutamato, isoleucina e metionina (TABELA 2). A liberação destes aminoácidos, combinada com a possibilidade da presença de peptídeos de baixo peso molecular, podem contribuir para a formação de um hidrolisado proteico com um sabor amargo, o que seria uma característica desfavorável para a indústria de alimentos (KRISTINSSON; RASCO, 2000b).

No entanto, a avaliação dos aminoácidos essenciais observados no hidrolisado proteico de cabeça de atum, com referência aos requisitos do padrão de proteína da FAO / WHO (2007) para adultos (histidina, isoleucina, leucina, lisina, metionina, cisteína, fenilalanina + tirosina, treonina, triptofano e valina), demonstra sua alta qualidade biológica (TABELA 2). Isso indica que a produção de hidrolisado proteico a partir dessa matéria-prima pode ser uma boa alternativa para a obtenção de um novo ingrediente funcional o qual combina alto valor nutritivo e potencial antioxidante.

5.3 EFEITO DA ALCALASE NA FRAÇÃO LIPÍDICA DA CABEÇA DE ATUM

O percentual das diferentes fases formadas após centrifugação do Hidrolisado Proteico de cabeça de Atum (HPA) e da Fase Emulsão (FE) concentrada são mostrados na FIGURA 1.

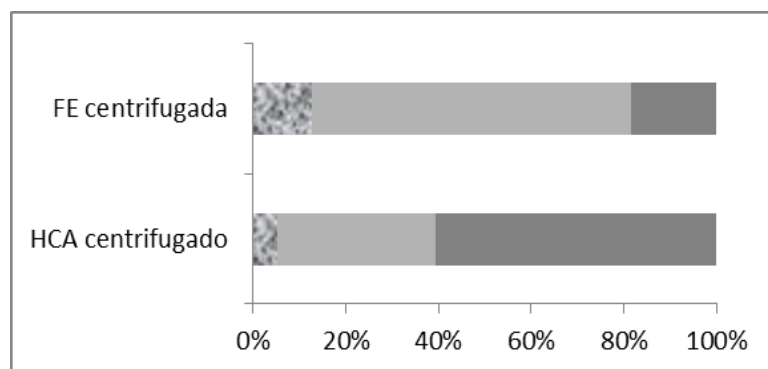


FIGURA 1 – PERCENTUAL DE CADA FASE FORMADA APÓS A CENTRIFUGAÇÃO DO HIDROLISADO PROTEICO DE CABEÇA DE ATUM (HPA) E DA FASE EMULSÃO (FE) CONCENTRADA: ■FASE ÓLEO (FO); ■FASE EMULSÃO (FE); ■FASE AQUOSA (FA)
FONTE: O AUTOR

Após a centrifugação do HPA, a Fase Óleo (FO) representou $5,2 \% \pm 0,4$, enquanto que a Fase Aquosa (FA) apresentou um maior percentual de $60,7 \% \pm 1,0$, seguido da Fase Emulsão (FE) com $34,1 \% \pm 1,4$. Contudo, observou-se que após a centrifugação da FE concentrada, foi possível aumentar o percentual da FO ($12,7 \% \pm 0,2$). Esse resultado indica que a maior parte do óleo estava presente na FE. De acordo com KECHAOU *et al.* (2009), a formação dessa fase depende das condições de agitação e sua formação pode influenciar na distribuição do óleo pelas diferentes fases do hidrolisado proteico. Segundo Daukšas *et al.* (2005), o fator que mais influencia o rendimento das diferentes frações é a adição de água, em vez do tipo de enzima utilizada. A redução da emulsão pode ser alcançada por redução e/ou eliminação da adição de água à mistura da hidrólise (DAUKŠAS *et al.*, 2005).

O rendimento do teor de lipídeos totais na matéria-prima (cabeças de atum) obtido, em percentual, pelo método padrão soxhlet do óleo recuperado após centrifugação do hidrolisado proteico de cabeça de atum (HPA) e da fase emulsão (FE) concentrada são apresentados na FIGURA 2.

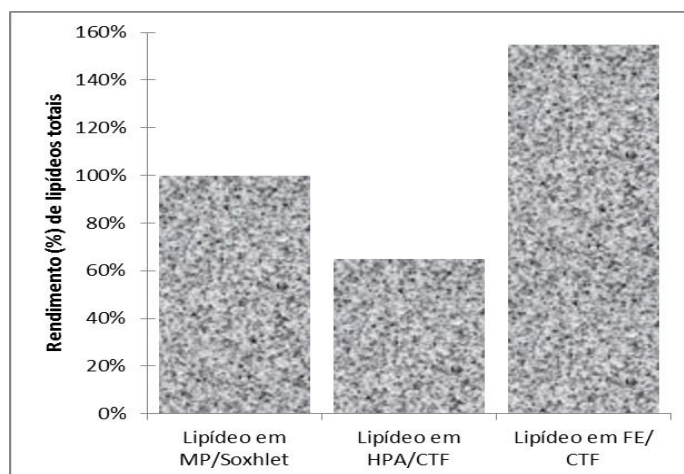


FIGURA 2 – RENDIMENTO (%) DO TEOR DE LIPÍDEOS TOTAIS NA MATÉRIA-PRIMA (MP) OBTIDO PELO MÉTODO PADRÃO SOXHLET DO ÓLEO RECUPERADO APÓS CENTRIFUGAÇÃO (CTF) DO HIDROLISADO PROTEICO DE CABEÇA DE ATUM (HPA) E DA FASE EMULSÃO (FE) CONCENTRADA.
FONTE: O AUTOR

A recuperação do óleo do hidrolisado proteico de cabeça de atum foi de 65 %, considerando os lipídeos totais na matéria-prima extraídos pelo método padrão (Soxhlet) como 100 %, resultado similar ao obtido por Hathwar *et al.* (2011) a partir do hidrolisado de vísceras de carpas indianas. Contudo, avaliando o rendimento do teor de óleo recuperado da Fase Emulsão concentrada, observa-se que foi possível ultrapassar o percentual de lipídeos totais na matéria-prima, obtido pelo método padrão (Soxhlet), recuperando por centrifugação, 155 % do óleo (FIGURA 2).

Esse resultado corrobora com os estudos de Kechaou *et al.* (2009) e Dumay *et al.* (2006), que observaram que em comparação com a extração com solvente, a alteração nos tecidos ocasionada pela enzima exógena promove um aumento da extração de lipídeos, isso indica que uma única extração clássica com solventes orgânicos não é completa. Portanto, o total de lipídeos pode ser recuperado através de processos sustentáveis, ou seja, sem o uso de solventes (DUMAY *et al.*, 2006). Além disso, as fases líquidas podem ser utilizadas como ração, fonte de nitrogênio em crescimento microbiano e ingrediente alimentar, devido ao seu alto valor nutritivo, propriedades funcionais e bioativas (GUERARD *et al.*, 2002; LIASET *et al.*, 2003; JE *et al.*, 2005; NILSANG *et al.*, 2005; LIU *et al.*, 2010; ZENG *et al.*, 2012; HE; FRANCO; ZHANG, 2012; CHUESIANG e SANGUANDEEKU, 2015).

O perfil de ácidos graxos do óleo recuperado do hidrolisado proteico de cabeça de atum, apresentado na TABELA 3, demonstra que o óleo foi caracterizado por um elevado percentual de ácidos graxos poli-insaturados (AGPI) (39,06 %), representados principalmente pelos ácidos graxos ω 3, Docosahexadienoico (DHA) e Eicosapentaenoico (EPA), que são

valorizados por suas propriedades profiláticas e terapêuticas, em diversas enfermidades e situações nutricionais, as quais têm sido amplamente demonstradas pela literatura científica e médica (VALENZUELA; UAUY, 1999; SANHUEZA; NIETO; VALENZUELA, 2004; KLINKESORN *et al.*, 2004; LEE *et al.*, 2008).

TABELA 3 – PERFIL DE ÁCIDOS GRAXOS DO ÓLEO DE CABEÇA DE ATUM RECUPERADO DO HIDROLISADO PROTEICO DE CABEÇA DE ATUM (HPA)

| Ácido graxo | Unidade (g/100g) |
|------------------------------------|------------------|
| C14:0 – Merístico | 3,35 |
| C15:0 – Pentadecanoico | 0,93 |
| C16:0 – Palmitico | 21,37 |
| C18:0 – Esteárico | 6,03 |
| C24:0 – Lingnocérico | 1,65 |
| Σ Saturados | 33,33 |
| C16:1 – Palmitoleico | 4,37 |
| C18:1-n9c – Oleico | 20,97 |
| C22:1n9 – Eurucico | 2,30 |
| Σ Monoinsaturados | 27,64 |
| C18:2-n6c – Linoleico | 1,21 |
| C18:3n3 – Linolênico | 3,14 |
| C20:4n6 – Araquidônico | 1,51 |
| C20:5n3 – Eicosapentaenoico (EPA) | 6,05 |
| C22:6n3 – Docosahexadienoico (DHA) | 27,15 |
| Σ Poli-insaturados | 39,06 |

Perfis de ácidos graxos de óleos de atum, semelhante ao apresentado neste estudo, foram encontrados por Chotimarkorn, Benjakul e Silalai (2008) e Wongsakul *et al.* (2003) em óleo comestível comercial e em óleo refinado de cabeças de atum, respectivamente. Óleo de atum contém mais ácido docosahexadienoico (DHA) do que o ácido eicosapentaenoico (EPA). Pesquisas demonstram que dieta rica em DHA é mais eficaz na redução dos sintomas alérgicos do que a dieta rica em ácido eicosapentaenoico (VAN DEN ELSEN *et al.*, 2013; VAN DEN ELSEN *et al.*, 2014). Os resultados destas pesquisas podem ser úteis para futuras intervenções destinadas a prevenir ou tratar os sintomas de alergia alimentar.

Ácidos graxos poli-insaturados também desempenham um papel importante na manutenção das funções do coração e do cérebro. Óleo de peixe recuperado a partir de coprodutos (vísceras ou cabeças) de peixe, extraído através de abordagens biotecnológicas livres de solvente, pode ser eficaz na redução do colesterol, atividade da enzima HMG CoA

reduzase, tendo efeito semelhante ao de óleos de peixes comerciais, na redução do risco de insuficiência cardíaca e distúrbios neuropsiquiátricos (RAI; BHASKAR; BASKARAN, 2013).

Pesquisas com diferentes proteases demonstram que não houve alteração significativa no perfil de ácido graxo em óleo de pescado recuperado por hidrólise enzimática (DUMAY; BARTHOMEUF; BERGE, 2004; DUMAY *et al.*, 2009; RAI; BHASKAR; BASKARAN, 2013; HATHWAR *et al.*, 2011). Contudo, em comparação com a extração clássica com solvente, uma elevação do percentual do ácido eicosapentaenoico (EPA) nos lipídeos totais, após a utilização de enzimas proteolíticas em coprodutos de bacalhau (*Gadus morhua*), pode ser observada na maior parte dos experimentos realizados por Dumay *et al.* (2004).

Os resultados encontrados no presente estudo, realizado com cabeças de atum, ratifica que a hidrólise enzimática pode ser uma técnica eficaz para a recuperação de óleo, sem afetar a sua qualidade, tornando-se uma melhor alternativa para o óleo de peixe comercial. De acordo com Rai, Bhaskar e Baskaran (2013), a utilização desses lipídeos, ricos em ácidos graxos $\omega 3$ com potenciais atividades biológicas, proporciona um meio de valorizar coprodutos de peixe, possibilitando agregar valores à cadeia produtiva pesqueira.

6 CONCLUSÃO

Esse trabalho apresenta a utilização de protease comercial no fornecimento de uma solução sustentável e viável para reduzir problemas de eliminação de resíduos, associados ao processamento de peixes, possibilitando agregar valor aos coprodutos, tais como cabeças de atum. Além dos já conhecidos valiosos produtos do hidrolisado proteico de peixe (HPP), os resultados demonstraram que os ácidos graxos insaturados e peptídeos antioxidantes também podem ser recuperados por um processo sustentável, ou seja, sem o uso de solventes, tais como a hidrólise enzimática e a aplicação de tecnologia de centrifugação. Além disso, este estudo é um dos poucos encontrados na literatura a testar a capacidade antioxidante dos peptídeos de HPP por uma técnica que mais se aproxima das condições redox que ocorrem em meio fisiológico, o *Oxygen Radical Absorbance Capacity* (ORAC). Portanto, a recuperação simultânea de moléculas com demonstradas atividades biológicas, a partir da hidrólise enzimática de cabeças de peixe, pode proporcionar um meio de agregar valor a esses produtos, sendo uma proposta mais eficiente na gestão dos resíduos da indústria pesqueira.

REFERÊNCIAS

ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS. **Official Methods of analysis of the Association of Official Analytical Chemists** 18 th Revised edn., Gaithersburg. 2003.

ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS. **Official Methods of analysis of the Association of Official Analytical Chemists** (method 900.02). Arlington: A.O.A.C., chapter 44, p. 3, 1996.

ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS. **Official methods of analysis of the Association of Official Analytical Chemists**. Arlington: A.O.A.C., 16th ed., chapter 33, p. 10-12, 1995.

BALASUNDRAM, N.; SUNDRAM, K.; SAMMAN, S. Phenolic compounds in plants and agri-industrial by-products: Antioxidant activity, occurrence, and potential uses. **Food Chemistry**, v.99, n.1, p.191-203, 2006.

BATISTA, I.; RAMOS, C.; COUTINHO, J.; BANDARRA, N. M.; NUNES, M. L. Characterization of protein hydrolysates and lipids obtained from black scabbardfish (*Aphanopus carbo*) by-products and antioxidative activity of the hydrolysates produced. **Process Biochemistry**, v.45, n.1, p.18-24, 2010.

BATISTA, I. Hidrolisado proteico de pescado. In GONÇALVES, A. A. **Tecnologia do pescado – Ciência, tecnologia, inovação e legislação**. Atheneu, p. 386-398, 2011. 624p.

BENZIE, I. F. F.; STRAIN, J. J.; The Ferric Reducing Ability of Plasma (FRAP) as a Measure of “Antioxidant Power”: The FRAP Assay. **Analytical Biochemistry**, v.239, n.1, p.70-76, 1996.

BERGER, R. G.; LUNKENBEIN, S.; STRÖHLE, A.; HAHN, A. Antioxidants in Food: Mere Myth or Magic Medicine? **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v.52, n.2, p.162-171, 2011.

BOUGATEF, A.; NEDJAR-ARROUME, N.; MANNI, L.; RAVALLEC, R.; BARKIA, A.; GUILLOCHON, D.; NASRI, M. Purification and identification of novel antioxidant peptides from enzymatic hydrolysates of sardinelle (*Sardinella aurita*) by-products proteins. **Food Chemistry**, v.118, n.3, p.559-565, 2010.

CHOTIMARKORN, C.; BENJAKUL, S.; SILALAI, N. Antioxidative effects of rice bran extracts on refined tuna oil during storage. **Food Research International**, v.41, n.6, p.616-622, 2008.

CHUESIANG, P.; SANGUANDEEKUL, R. Protein hydrolysate from tilapia frame: antioxidant and angiotensin I converting enzyme inhibitor properties. **International Journal of Food Science and Technology**, 2015 doi:10.1111/ijfs.12762

CHURCH, F. C.; SWAISGOOD, H. E.; PORTER, D.H.; CATIGNANI, G. L. Spectrophotometric Assay Using o-Phthaldialdehyde for Determination of Proteolysis in Milk and Isolated Milk Proteins1. **Journal of Dairy Science**, v.66, n.6, p.1219-1227, 1983.

DAUKŠAS, E.; FALCH, E.; ŠLIŽYTĖ, R.; RUSTAD, T. Composition of fatty acids and lipid classes in bulk products generated during enzymic hydrolysis of cod (*Gadus morhua*) by-products. **Process Biochemistry**, v.40, n.8, p.2659-2670, 2005.

DÁVALOS, A.; GÓMEZ-CORDOVÉS, C.; BARTOLOMÉ, B. Extending applicability of the oxygen radical absorbance capacity (ORAC–fluorescein) assay. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.52, n.1, p.48-54, 2004.

DIETERICH, F.; BOSCOLO, W. R.; PACHECO, M. T. B.; SILVA, V. S. N.; GONÇALVES, G. S.; VIDOTTI R. M. Development and Characterization of Protein Hydrolysates Originated from Animal Agro Industrial Byproducts. **Journal of Dairy, Veterinary & Animal Research**, v.1, n.2, p. 1-7, 2014.

DUMAY, J.; DONNAY-MORENO, C.; BARNATHAN, G.; JAOUEN, P.; BERGE, J. P. Improvement of lipid and phospholipid recoveries from sardine (*Sardina pilchardus*) viscera using industrial proteases. **Process Biochemistry**, v.41, p. 2327–2332, 2006.

DUMAY, J.; ALLERY, M.; DONNAY-MORENO, C.; BARNATHAN, G.; JAOUEN, P.; CARBONNEAU, M. E.; BERGÉ, J. P. Optimization of hydrolysis of sardine (*Sardina pilchardus*) heads with Protamex: enhancement of lipid and phospholipid extraction. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v.89, n.9, p.1599-1606, 2009.

DUMAY, J.; BARTHOMEUF, C.; BERGE, J. P. How Enzymes May Be Helpful for Upgrading Fish By-Products. **Journal of Aquatic Food Product Technology**, v.13, n.2, p.69-84, 2004.

ELIAS, R. J.; KELLERBY, S. S.; DECKER, E. A. Antioxidant Activity of Proteins and Peptides. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v.48, n.5, p.430 – 441, 2008.

ERDMANN, K.; CHEUNG, B. W. Y.; SCHRÖDER, H. The possible roles of food-derived bioactive peptides in reducing the risk of cardiovascular disease. **The Journal of Nutritional Biochemistry**, v.19, n.10, p.643-654, 2008.

FAO/WHO. Protein and amino acid requirements in human nutrition: report of a joint FAO/WHO/UNU expert consultation. In: **Food and Agriculture Organization and World Health Organization WHO Technical Report Series**, Geneva, 2007.

GBOGOURI, G. A.; LINDER, M.; FANNI, J.; PARMENTIER, M. Analysis of lipids extracted from salmon (*Salmo salar*) heads by commercial proteolytic enzymes. **European Journal Lipid Science Technology**, v. 108, p. 766–775. 2006.

GIRGIH, A. T.; HE, R.; HASAN, F. M.; UDENIGWE, C. C.; GILL, T. A.; ALUKO, R. E. Evaluation of the in vitro antioxidant properties of a cod (*Gadus morhua*) protein hydrolysate and peptide fractions. **Food Chemistry**, v.173, n.0, p.652-659, 2015.

GIRGIH, A. T.; UDENIGWE, C. C.; HASAN, F. M.; GILL, T. A.; ALUKO, R. E. Antioxidant properties of Salmon (*Salmo salar*) protein hydrolysate and peptide fractions isolated by reverse-phase HPLC. **Food Research International**, v.52, n.1, p.315-322, 2013.

GUERARD F, GUIMAS L, BINET A. Production of tuna waste hydrolysates by a commercial neutral protease preparation. **Journal of molecular catalysis b: enzymatic**, v. 19, n.20, P.489-98, 2002.

HAGEN, S.; FROST, B.; AUGUSTIN, J. Precolumn phenylisothiocyanate derivatization and liquid chromatography of amino acids in food, **Journal Association of Official Analytical Chemists**, v.72, n.6, p.912-916, 1989.

HALLIWELL, B.; WHITEMAN, M. Measuring reactive species and oxidative damage in vivo and in cell culture: how should you do it and what do the results mean? **British Journal of Pharmacology**, v.142, n.2, p.231-55, 2004.

HARNEDY, P. A.; FITZGERALD, R. J. Bioactive peptides from marine processing waste and shellfish: A review. **Journal of Functional Foods**, v.4, n.1, p.6-24, 2012.

HATHWAR, S.; BIJINU, B.; RAI, A.; NARAYAN, B. Simultaneous Recovery of Lipids and Proteins by Enzymatic Hydrolysis of Fish Industry Waste Using Different Commercial Proteases. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v.164, n.1, p.115-124, 2011.

HE, S.; FRANCO, C.; ZHANG, W. Process optimisation and physicochemical characterisation of enzymatic hydrolysates of proteins from co-products of Atlantic Salmon (*Salmo salar*) and Yellowtail Kingfish (*Seriola lalandi*). **International Journal Of Food Science And Technology**, v.47, n.11, p.2397-2404, 2012.

HUANG, D.; OU, B.; PRIOR, R. L. The Chemistry behind Antioxidant Capacity Assays. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.53, n.6, p.1841-1856, 2005.

JAMDAR, S. N.; RAJALAKSHMI, V.; PEDNEKAR, M. D.; JUAN, F.; YARDI, V.; SHARMA, A. Influence of degree of hydrolysis on functional properties, antioxidant activity and ACE inhibitory activity of peanut protein hydrolysate. **Food Chemistry**, v.121, p.178-184, 2010.

JAO, C. L.; KO, W. C. 1,1-Diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH) radical scavenging by protein hydrolysates from tuna cooking juice. **Fisheries Science**, v.68, p.430-435, 2002.

JE, J. Y.; PARK, P. J.; KIM, S. K. Antioxydant activity of a peptide isolated from Alaska pollack (*Theraga chalcogramma*) frame protein hydrolysate. **Food Research International**, v.38, p.45–50, 2005.

JUN, S-Y.; PARK, P-J.; JUNG, W-K.; KIM, S-K. Purification and characterization of an antioxidative peptide from enzymatic hydrolysate of yellowfin sole (*Limanda aspera*) frame protein. **Europe Food Research Technology**, v.219, n.1, p.20-26, 2004.

KECHAOU, E. S.; DUMAY, J.; DONNAY-MORENO, C.; JAOUEN, P.; GOUYGOU, J-P.; BERGÉ, J-P.; AMAR, R. B. Enzymatic hydrolysis of cuttlefish (*Sepia officinalis*) and sardine (*Sardina pilchardus*) viscera using commercial proteases: Effects on lipid distribution and amino acid composition. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v.107, n.2, p.158-164, 2009.

KIM, S-K.; WIJESEKARA, I. Development and biological activities of marine-derived bioactive peptides: A review. **Journal of Functional Foods**, v.2, n.1, p.1-9, 2010.

KLINKESORN, U.; H-KITTIKUN, A.; CHINACHOTI, P.; SOPHANODORA, P. Chemical transesterification of tuna oil to enriched omega-3 polyunsaturated fatty acids. **Food Chemistry**, v.87, n.3, p.415-421, 2004.

KLOMPONG, V.; BENJAKUL, S.; KANTACHOTE, D.; HAYES, K. D.; SHAHIDI, F. Comparative study on antioxidative activity of yellow stripe trevally protein hydrolysate produced from Alcalase and Flavourzyme. **International Journal of Food Science and Technology**, v.43, p.1019–1026, 2008.

KRISTINSSON, H. G.; RASCO, B. A. Fish Protein Hydrolysates: Production, Biochemical, and Functional Properties. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v.40, n.1 p.43-81, 2000b.

KRISTINSSON, H. G.; RASCO, B. A. Kinetics of the hydrolysis of Atlantic salmon (*Salmo salar*) muscle proteins by alkaline proteases and a visceral serine protease mixture. **Process Biochemistry**, v.36, n.1–2, p.131-139, 2000a.

LAPLANTE, S.; SOUCHET, N.; BRYL, P. Comparison of low-temperature processes for oil and coenzyme q10 extraction from mackerel and herring. **European Journal of Lipid Science and Technology**, v. 111, p. 135–141, 2009.

LEE, J. H.; O'KEEFE, J. H.; LAVIE, C. J.; MARCHIOLI, R.; HARRIS, W. S. Omega-3 Fatty Acids for Cardioprotection. **Mayo Clinic Proceedings**, v.83, n.3, p.324-332, 2008.

LIASET, B.; JULSHAM, K.; ESPE, M. Chemical composition and theoretical nutritional evaluation of the produced fractions from enzymic hydrolysis of salmon frames with Protamex. **Process Biochemistry**, v.38, p.1747–59, 2003.

LIU, G. M.; CAO, M. J.; YU, H. L.; HU, Y. H.; ZHANG, L. J.; SU, W.J. Optimisation of enzymatic hydrolysis of the by-products of marine crab processing using mixed enzymes. **International Journal Of Food Science And Technology**, v.45, n.6, p.1198-1204, 2010.

LIU, Q.; KONG, B.; XIONG, Y. L.; XIA, X. Antioxidant activity and functional properties of porcine plasma protein hydrolysate as influenced by the degree of hydrolysis. **Food Chemistry**, v. 118, n.2, p.403-410, 2010.

MAGALHÃES, L. M.; SEGUNDO, M. A.; REIS, S.; LIMA, J. L. F. C. Methodological aspects about in vitro evaluation of antioxidant properties. **Analytica Chimica Acta**, v.613, n.1, p.1-19, 2008.

MÖLLER, N.; SCHOLZ-AHRENS, K.; ROOS, N.; SCHREZENMEIR, J. Bioactive peptides and proteins from foods: indication for health effects. **European Journal of Nutrition**, v.47, n.4, p.171-182, 2008.

MOREIRA, E. A. M.; SHAMI, N. J. I. E. Licopeno como agente antioxidante. **Revista de Nutrição**, Campinas, v. 17, n. 2, p.227-236, 2004.

NACZK, M.; SHAHIDI, F. Phenolics in cereals, fruits and vegetables: Occurrence, extraction and analysis. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v.41, n.5, p.1523-1542, 2006.

NALINANON, S.; BENJAKUL, S.; KISHIMURA, H.; SHAHIDI, F. Functionalities and antioxidant properties of protein hydrolysates from the muscle of ornate threadfin bream treated with pepsin from skipjack tuna. **Food Chemistry**, v.124, n.4, p.1354-1362, 2011.

NGUYEN, T-M-H.; SYLLA, K.; SERIGNE, B.; RANDRIAMAHATODY, ZO.; DONNAY-MORENO, C.; MOREAU, J.; LUYEN, T. T.; BERGE, J-P. Enzymatic Hydrolysis of Yellowfin Tuna (*Thunnus albacares*) By-Products Using Protamex Protease. **Food Technol Biotechnol**, v.49, n.1, p.48-55, 2011.

NIELSEN, P. M.; PETERSEN, D.; DAMBMANN, C. Improved Method for Determining Food Protein Degree of Hydrolysis. **Journal of Food Science**, v. 66, n.5, p.642-646, 2001.

NILSANG, S.; LERTSIRI, S.; SUPHANTHARIKA, M.; ASSAVANIG, A. Optimization of enzymatic hydrolysis of fish soluble concentrate by commercial proteases. **Journal Food Engineering**, v.70, p.571-8, 2005.

ORSINI, D. M. C.; TIRONI, V. A.; AÑÓN, M. C. Antioxidant activity of amaranth protein or their hydrolysates under simulated gastrointestinal digestion. **LWT - Food Science and Technology**, v. 44, n.8, p.1752-1760, 2011.

PEÑA-RAMOS, E. A.; XIONG, Y. L.; ARTEAGA, G. E. Fractionation and characterisation for antioxidant activity of hydrolysed whey protein. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v.84, n.14, p.1908-1918, 2004.

RAI, A. K.; BHASKAR, N.; BASKARAN, V. Bioefficacy of EPA-DHA from lipids recovered from fish processing wastes through biotechnological approaches. **Food Chemistry**, v.136, n.1, p.80-86, 2013.

RANATHUNGA, S., RAJAPAKSE, N., KIM, S. K. Purification and characterization of antioxidative peptide derived from muscle of conger eel (*Conger myriaster*). **European Food Research and Technology**. v. 222, p. 310-315. 2006.

RE, R.; PELLEGRINI, N.; PROTEGGENTE, A.; PANNALA, A.; YANG, M.; RICE-EVANS, C. Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. **Free Radical Biology and Medicine**, v.26, n.9-10, p.1231-1237, 1999.

REN, J.; ZHAO, M.; SHI, J.; WANG, J.; JIANG, Y.; CUI, C.; KAKUDA, Y.; XUE, S. J. Purification and identification of antioxidant peptides from grass carp muscle hydrolysates by consecutive chromatography and electrospray ionization-mass spectrometry. **Food Chemistry**, v.108, n.2, p.727-736, 2008.

RUSTAD, T.; STORRØ, I.; SLIZYTE, R. Possibilities for the utilisation of marine by-products. **International Journal of Food Science & Technology**, v.46, n.10, p.2001-2014, 2011.

SAIDI, S.; DERATANI, A.; BELLEVILLE, M-P.; BEN, A. R. Antioxidant properties of peptide fractions from tuna dark muscle protein by-product hydrolysate produced by membrane fractionation process. **Food Research International**, v.65, Part C. n.0, p.329-336, 2014.

SAMARANAYAKA, A. G. P.; LI-CHAN, E. C. Y. Food-derived peptidic antioxidants: A review of their production, assessment, and potential applications. **Journal of Functional Foods**, v.3, n.4, p.229-254, 2011.

SANHUEZA, J.; NIETO, S.; VALENZUELA, A. Acido docosahexaenoico (DHA), desarrollo cerebral, memoria y aprendizaje: la importancia de la suplementación perinatal. **Revista Chilena de Nutrición**, v.31, p.84-92, 2004.

SHAHIDI, F.; ZHONG, Y. Novel antioxidants in food quality preservation and health promotion. **European Journal of Lipid Science and Technology**, v.112, n.9, p.930-940, 2010.

SLIZYTE, R.; RUSTAD, T.; STORRØ, I. Enzymatic hydrolysis of cod (*Gadus morhua*) by-products – optimization of yield and properties of lipid and protein fractions. **Process Biochemistry**, v. 40, p. 3680–3692, 2005.

VALENZUELA, A.; UAUY, R. Consumption pattern of dietary fats in Chile N-6 and n-3 fatty acids. **International Food Science Nutrition**, v.50, p.127-133, 1999.

VALTUEÑA, S.; PELLEGRINI, N.; FRANZINI, L.; BIANCHI M. A.; ARDIGÒ, D.; DEL RIO, D.; PIATTI, P.; SCAZZINA, F.; ZAVARONI, I.; BRIGHENTI, F. Food selection based on total antioxidant capacity can modify antioxidant intake, systemic inflammation, and liver function without altering markers of oxidative stress. **The American Journal of Clinical Nutrition**, v.87, n.5, p.1290-1297, 2008.

VAN DEN ELSEN, L. W. J.; BOL-SCHOENMAKERS, M.; VAN ESCH, B. C. A. M.; HOFMAN, G. A.; VAN DE HEIJNING, B. J. M.; PIETERS, R. H.; SMIT, J. J.; GARSSSEN, J.; WILLEMSSEN, L. E. M. DHA-Rich Tuna Oil Effectively Suppresses Allergic Symptoms in Mice Allergic to Whey or Peanut1–3. **The Journal of Nutrition and Disease**, v.12, p.1970-1976, 2014.

VAN DEN ELSEN, L. W. J.; VAN ESCH, B. C. A. M.; HOFMAN, G. A.; KANT, J.; VAN DE HEIJNING, B. J. M.; GARSSSEN, J.; WILLEMSSEN, L. E. M. Dietary long chain n-3 polyunsaturated fatty acids prevent allergic sensitization to cow's milk protein in mice. **Clinical & Experimental Allergy**, v.43, p.798–810, 2013.

WHITE, J. A.; HART, R. J.; FRY, J. C. An evaluation of the waters pico-tag system for the amino-acid-analysis of food materials. **Journal of Automatic Chemistry**, v.8, n.4, p.170-177, 1986.

WONGSAKUL, S.; PRASERTSAN, P.; BORNSCHEUER, U. T.; H-KITTIKUN, A. Synthesis of 2-monoglycerides by alcoholysis of palm oil and tuna oil using immobilized lipases. **European Journal of Lipid Science and Technology**, v.105, n.2, p.68-73, 2003.

WU, H-C.; CHEN, H-M.; SHIAU, C-Y. Free amino acids and peptides as related to antioxidant properties in protein hydrolysates of mackerel (*Scomber austriasicus*). **Food Research International**, v.36, n.9-10, p.949-957, 2003.

YANG, P.; KE, H. Q.; HONG, P. Z.; ZENG, S. K.; CAO, W. H. Antioxidant activity of bigeye tuna (*Thunnus obesus*) head protein hydrolysate prepared with Alcalase. **International Journal of Food Science and Technology**, v.46, n.12, p.2460-2466, 2011.

YOU, L.; ZHAO, M.; REGENSTEIN, J. M.; REN, J. Purification and identification of antioxidative peptides from loach (*Misgurnus anguillicaudatus*) protein hydrolysate by consecutive chromatography and electrospray ionization-mass spectrometry. **Food Research International**, v.43, n.4, p.1167-1173, 2010.

ZENG, K. Y.; ZHANG, X.; GUAN, Y.; SUN, Y. Enzymatic hydrolysates from tuna backbone and the subsequent Maillard reaction with different. **International Journal of Food Science and Technology**, v.47, p.1293–1301, 2012.

**CAPÍTULO 3 - EXTRAÇÃO E COMPARAÇÃO DO ÓLEO DE CABEÇAS DE ATUM
(*Thunnus albacares*) OBTIDO PELO MÉTODO POR COCÇÃO (INDUSTRIAL),
MÉTODO BLIGH E DYER, E VIA HIDRÓLISE ENZIMÁTICA**

EXTRAÇÃO E COMPARAÇÃO DO ÓLEO DE CABEÇAS DE ATUM (*Thunnus albacares*) OBTIDO PELO MÉTODO INDUSTRIAL, MÉTODO BLIGH E DYER, E VIA HIDRÓLISE ENZIMÁTICA

1 RESUMO

O objetivo do estudo apresentado neste capítulo foi comparar a qualidade do óleo de cabeça de atum (*Thunnus albacares*) obtido pelo método de extração por cocção (método industrial) (OI) e pelos métodos de extração alternativos a baixa temperatura (Bligh & Dyer (OBD) e hidrólise enzimática (OHE). A temperatura utilizada nas etapas do processo de obtenção do óleo extraído pelo método industrial (OI), bem como os reagentes utilizados nas etapas do processo de obtenção do óleo extraído pelo método Bligh & Dyer (OBD) podem ter influenciado o desencadeamento de processos oxidativos, visto que apresentaram maiores valores para o índice de peróxido (10,75 e 10,45 meq O₂/kg de óleo, respectivamente) e índice de acidez (4,0 e 2,3 % ácido oléico, respectivamente). O processo de extração também influenciou o perfil dos ácidos graxos dos óleos obtidos, principalmente nos teores de ácidos graxos poli-insaturados, sendo a metodologia de extração via hidrólise enzimática a que atribuiu as melhores características em relação à qualidade e propriedade funcional do óleo por apresentar maiores teores de ácido eicosapentaenoico (EPA) e ácido docosahexaenóico (DHA) e menores valores dos índices de qualidade analisados, como os índices de peróxido e acidez. Assim, a produção de óleo a partir de cabeças de atum via hidrólise enzimática pode promover a produção de óleo rico em ômega-3, o que pode ser uma boa oportunidade para valorizar coprodutos de peixe e possivelmente aumentar a competitividade da indústria pesqueira.

Palavras-chave: Processos de extração do óleo, cabeças de atum, enzima, perfil de ácidos graxos, omega-3, indústria pesqueira.

**EXTRACTION AND SIMILARITY OF TUNA (*Thunnus albacares*) HEADS OIL
OBTAINED BY EXTRACTION METHOD USING SOLVENT (BLIGH AND DYER),
BY INDUSTRY EXTRACTION AND FOR ALTERNATIVE METHOD VIA
HYDROLYSIS ENZYMATIC**

2 ABSTRACT

The aim of this chapter was to compare the quality of the oil from by-product of tuna yellowfin (*Thunnus albacares*) obtained by industrial extraction method (HI) and the alternative methods of extraction at low temperature (Bligh & Dyer (OBD) and enzymatic hydrolysis (OHE). The temperature and chemical reagents used in the oil extraction processes by industrial method (HI) and by the Bligh & Dyer method (OBD), may have influenced the triggering of oxidative processes, once it showed higher values for peroxide (10.75 and 10.45 meq O₂.Kg⁻¹, respectively) and acidity (4.0 and 2.3 % oleic acid, respectively). The extraction process also influenced the oil fatty acids profile, mainly for polyunsaturated fatty acids, being extraction method by enzymatic hydrolysis which presents the best features in quality and functional property of the oil, showing the higher levels of eicosapentaenoic acid (EPA) and docosahexaenoic acid (DHA) and lower values of the quality parameters analyzed, as peroxide and acidity. Thus the production of oil from tuna heads via enzymatic hydrolysis can promote oil production rich in omega-3, which can be a good opportunity to enhance fish by-products and possibly increase the competitiveness of the fishing industry.

Keywords: oil extraction processes, tuna by-products, enzyme, fatty acid profile, omega-3, fishing industry.

3 INTRODUÇÃO

O aproveitamento de resíduos de peixe marinhos vem tornando-se cada vez mais promissor por ser considerada uma biomassa com propriedades nutricionais elevadas. Os resíduos de atum constituem uma matéria-prima de interesse devido à sua importância econômica mundial e ao comércio internacional de conservas (GUERARD *et al.*, 2002). Os resíduos sólidos ou coprodutos gerados pela indústria de conservas de atum podem chegar até 65 % da matéria-prima original, e isso inclui cabeças, ossos, vísceras, brânquias, músculo escuro e pele (FAO, 2014).

Os resíduos de pescado apresentam alto teor de proteínas, minerais e lipídeos (RUSTAD, 2003), os quais incluem ácidos graxos poli-insaturados, principalmente da série ômega-3 (n-3) e ômega-6 (n-6), considerados essenciais e assim importantes na dieta alimentar (BELDA *et al.*, 1991). Os óleos de peixe são considerados fonte comercial de ácido eicosapentaenoico (EPA) e ácido docosahexaenoico (DHA) e têm atraído a atenção da comunidade científica e industrial devido aos benefícios que pode trazer à saúde humana (KRIS-ETHERTON; HARRIS; APPEL, 2002; GELEIJNSE *et al.*, 2002; HARRIS, 2004; CARRERO *et al.*, 2005; BALK *et al.*, 2006; WANG *et al.*, 2006; SOUZA; ANIDO; TOGNON, 2007; HARRIS *et al.*, 2008; SILVA *et al.*, 2008; HARRIS *et al.*, 2009; MAZEREEUW *et al.*, 2012).

O óleo de peixe tem sido obtido industrialmente através da digestão e tratamento térmico da matéria-prima não aproveitável no processamento do pescado. Porém, por ser em sua maioria composto por ácidos graxos poli-insaturados, os lipídeos do pescado são mais susceptíveis à oxidação. Sendo assim, recomenda-se uma extração a baixa temperatura, tais como a extração com o dióxido de carbono supercrítico (SCO₂), a hidrólise enzimática (LAPLANTE; SOUCHET; BRYL, 2009) e a extração com solvente Bligh e Dyer (BLIGH; DYER, 1959). Entre essas técnicas, a enzimática, que promove a ruptura do tecido do peixe, pode ser uma alternativa promissora para separar os lipídeos de interesse sem comprometer o valor nutritivo, valorizando o óleo, pois mantém as propriedades químicas que ressaltam a qualidade do mesmo, o que pode viabilizar a venda a custos mais elevados para um mercado selecionado (DUMAY; BARTHOMEUF; BERGE, 2004; LINDER; FANNI; PARMENTIER, 2005).

Para a escolha do método de extração de óleo de peixe, a matéria-prima, assim como os parâmetros de processo são fatores que devem ser considerados, pois podem interferir na qualidade e no valor nutritivo desse óleo. Como tais interferentes foram pouco explorados até

o momento, o objetivo deste Capítulo 3 foi comparar a qualidade do óleo de resíduo de atum-galha-amarela (*Thunnus albacares*) obtido pelos métodos por cocção (método industrial), com solvente Bligh e Dyer e pelo método alternativo via hidrólise enzimática.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 MATERIAL

As cabeças de atum (*Thunnus albacares*), congeladas e acondicionadas em embalagem de rafia, foram gentilmente cedidas pela empresa Fishes Brazil (Espírito Santo, Brasil). O pescado foi identificado como sendo proveniente da costa espírito santense. A Alcalase 2.4L® foi obtida da Novozymes Latino Americana Ltda (Paraná, Brasil). Os reagentes de grau analítico foram adquiridos da Sigma (St. Louis, MO, USA).

4.2 COMPOSIÇÃO QUÍMICA DA MATÉRIA-PRIMA (CABEÇAS DE ATUM)

A determinação do conteúdo total de lípideo das cabeças de atum foi realizada pela metodologia de Soxhlet com éter de petróleo (método 920.39) (AOAC, 1995). O teor de proteína foi determinado pela Método de Kjeldahl (% nitrogen x 6,25) (método 991.20) (AOAC, 1995). A umidade foi obtida após secagem a 105 °C até a massa constante (método 930.15) (AOAC, 1995) e o teor de cinzas foi determinado após calcinação das amostras *overnight* a 550 °C (método 900.02) (AOAC, 1996). O conteúdo de carboidratos foi obtido por diferença.

4.3 EXTRAÇÃO PELO MÉTODO COM SOLVENTE A FRIO BLIGH & DYER

A extração do óleo de cabeça de atum (*Thunnus albacares*) pelo método com solvente a frio, foi realizada de acordo com Bligh & Dyer (1959). No início do processo, as cabeças de atum foram descongeladas e trituradas (5,0 mm) para obtenção de uma massa homogênea. Em seguida, 100g dessa amostra (massa de cabeças de atum) foram homogeneizados, durante 3 minutos, em béquer com agitação (520 RPM) com 100 mL de água destilada, 250 mL de clorofórmio e 200 mL de metanol. Após completa homogeneização, observou-se uma única fase. Filtrou-se a mistura a pressão reduzida e o resíduo tissular foi homogeneizado com 150 mL de clorofórmio, em béquer com agitação (520 RPM) por 2 minutos, realizando-se nova filtração a pressão reduzida. Os filtrados foram transferidos para um funil de separação e,

após agitação vigorosa, o funil de separação contendo a amostra diluída permaneceu em repouso por 15 minutos para a separação das fases. A fase inferior foi recolhida e os solventes foram eliminados em evaporador rotativo a pressão reduzida. O óleo obtido foi armazenado em frasco âmbar e mantido congelado a -20 °C até o momento das análises.

4.4 EXTRAÇÃO PELO PROCESSO DE COCÇÃO (MÉTODO INDUSTRIAL)

A extração do óleo de cabeça de atum (*Thunnus albacares*) pelo método por cocção (método industrial) foi baseada na metodologia aplicada por Crexi; Souza-Soares; Pinto (2009) realizado em escala de laboratório. No início do processo, as cabeças de atum foram descongeladas e trituradas (5,0 mm) para obtenção de uma massa homogênea. Em seguida, a matéria-prima foi submetida a cozimento a 95-100 °C, durante 30 minutos. Em seguida, peneirada em uma peneira de aço Inox - ASTM 18 - MESH/TYLER 16, para a remoção de espinhas. Para separação do óleo, o material foi centrifugado (HERMLE - 78564 Wehingen - Germany) durante 20 minutos a 4427 x g (6000 RPM). O produto resultante incluía três frações: o sólido de fundo, uma camada no meio aquoso, e a parte superior em camada de óleo. A fração de óleo foi separada das outras frações, armazenada em um frasco âmbar e mantida congelada a - 20 °C até o momento das análises.

4.5 EXTRAÇÃO PELO PROCESSO DE HIDRÓLISE ENZIMÁTICA

A metodologia utilizada para extração do óleo pelo processo de hidrólise enzimática está apresentada no CAPÍTULO 2, item 4.2.

4.6 CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA DOS ÓLEOS

4.6.1 Índice de refração (IR)

O índice de refração do óleo foi obtido em um refratômetro de Abbé a 40 °C equipado com escala-padrão segundo o método AOCS Cc 7 - 25 (AOCS, 1990). As análises foram realizadas em triplicata.

4.6.2 Índice de saponificação (IS)

O índice de saponificação do óleo de peixe foi determinado segundo metodologia AOCS Cd 3-25 (AOCS, 1990). As análises foram realizadas em triplicata e os resultados foram expressos como índice de saponificação em mg KOH/mg de amostra.

4.6.2 Índice de peróxido (IP)

O índice de peróxido foi definido segundo o método AOCS Cd 8-53 (AOCS, 1990). A análise foi realizada em triplicata e a concentração de peróxidos expressa em mEq de O₂/kg de óleo.

4.6.3 Índice de acidez (IA)

A determinação do índice de acidez do óleo foi realizada segundo metodologia AOCS Ca 5a-40 (AOCS, 1998). As análises foram realizadas em triplicata e os resultados expressos como índice de acidez em ácido oleico (% ácido oleico).

4.6.4 Índice de Iodo (II)

O índice de iodo foi determinado com base no perfil graxo dos ésteres obtidos, segundo método AOC Cd 1c-85 (AOCS, 1997) definido pela equação:

$$II \text{ (g iodo/g óleo)} = (\%C16:1 \times 0,9976) + (\%C18:1 \times 0,8986) + (\%C18 : 2 \times 1,810) + (\%C22 : 1 \times 0,7497).$$

As análises foram realizadas em triplicata e os resultados expressos como g I/ 100g óleo.

4.7 DETERMINAÇÃO DO PERFIL DE ÁCIDOS GRAXOS

A metodologia utilizada para a determinação do perfil de ácidos graxos está apresentada no CAPÍTULO 2, item 2.7.

4.8 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os dados foram apresentados em média \pm desvio padrão. Análise de variância ANOVA, teste de Tukey ao nível de 5 % foram realizados com o software STATISTICA 7.0

(Statsoft, Tulsa, USA). A avaliação da correlação entre as análises físico-químicas e o perfil de ácidos graxos dos óleos de cabeças de atum obtidos por diferentes métodos de extração foi realizada pela análise de componentes principais (ACP) através do software ORIGIN PRO 8.0 (Northampton, MA 01060, USA), que foi utilizado para construir a matriz de dados e esses foram processados pelo software MATLAB version 7.1 (Mathworks Inc.).

5 RESULTADOS E DISCUSSÕES

5.1 ANÁLISE FÍSICO-QUÍMICA DA MATÉRIA-PRIMA (CABEÇAS DE ATUM) E DOS ÓLEOS DE CABEÇAS DE ATUM OBTIDOS POR DIFERENTES MÉTODOS DE EXTRAÇÃO

A composição físico-química das cabeças de atum (matéria-prima) apresentou 70,1 % de umidade, 15,1 % de proteína, 8,0 % de lipídeo pelo método de Soxhlet, 5,18 % de cinzas e 1,62 % de carboidrato. A amostra caracterizou-se pelo elevado conteúdo de proteínas, fato comum para peixes em geral, em especial para resíduos desta espécie (RUSTAD, 2003). Em comparação com os valores obtidos no presente estudo, Nguyen *et al.* (2011) observaram em cabeças de atum no Vietnã valor semelhante para proteína (14,8 %) e valores superiores de lipídeos (13,5 %) e cinzas (11,8 %). Altos teores de cinzas pode ser resultado da presença de elevada proporção de ossos na matéria-prima utilizada, de acordo com Batista *et al.* (2010).

O índice de saponificação (IS), índice de peróxido (IP), índice de acidez (IA), índice de refração (IR) e índice de iodo (II) do óleo bruto extraído de cabeça de atum pelos diferentes métodos de extração com diferença significativa em nível de 5 % são apresentados na TABELA 1.

TABELA 1 - ANÁLISES FÍSICO-QUÍMICAS DOS ÓLEOS BRUTOS DE CABEÇAS DE ATUM OBTIDOS PELOS DIFERENTES MÉTODOS DE EXTRAÇÃO³

| Óleos | Análises | | | | |
|-------------------|------------------------------------|---|-----------------------------------|----------------------------------|------------------------------|
| | Índice de saponificação (mg KOH/g) | Índice de peróxido (mEq O ₂ /kg de óleo) | Índice de acidez (% ácido oléico) | Índice de Iodo (g I/ 100 g óleo) | Índice de refração (a 40 °C) |
| OI ¹ | 181,01 ^a ± 0,05 | 10,45 ^a ± 0,3 | 4,0 ^a ± 0,56 | 21,27 ^b ± 1,1 | 1,4783 ^b ± 0,02 |
| OBD | 188,46 ^a ± 0,18 | 10,75 ^a ± 0,03 | 2,3 ^b ± 0,2 | 62,11 ^a ± 0,8 | 1,4807 ^a ± 0,05 |
| OHE | 164,21 ^b ± 0,08 | 5,14 ^b ± 0,03 | 1,96 ^c ± 0,7 | 27,12 ^{ab} ± 2,1 | 1,4803 ^a ± 0,01 |
| DMS ^{**} | 19,67 | 4,38 | 0,24 | 0,014 | 0,0021 |

¹OI – Óleo extraído pelo método industrial; OBD - Óleo extraído pelo método Bligh & Dyer; OHE - Óleo extraído pelo método de Hidrólise enzimática;

²Médias seguidas de letras minúsculas distintas nas colunas diferem entre si pelo teste de Tukey, a 5 % de probabilidade. ^{**}DMS = diferença mínima significativa;

³Os resultados são valores médios de três determinações ± desvio padrão.

O índice de saponificação (IS) é uma medida do peso molecular e definida como a quantidade de álcali necessária para saponificar ácidos graxos em uma determinada massa de óleo (BORAN; KARAÇAM; BORAN, 2006). Os índices de saponificação do óleo bruto obtido pela extração por cocção (método industrial) (OI), do óleo bruto obtido pela extração alternativa à baixa temperatura Bligh & Dyer (OBD) e do óleo extraído via hidrólise enzimática (OHE) (181,01 mg KOH/g; 188,46 mg KOH/g; 164,21 mg KOH/g, respectivamente) (TABELA 1) foram menores do que os valores reportados para óleos brutos de tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*) e surubim híbrido (*Pseudoplatystoma corruscans* X *P. fasciatum*) (194,9676 mg KOH/g e 212,3032 mg KOH/g, respectivamente) (MENEGAZZO; PETENUCI; FONSECA, 2014).

Valores mais elevados de índice de peróxido (IP) foram observados para o óleo extraído por metodologia Bligh & Dyer e o óleo extraído pelo processo por cocção (método industrial), sendo estatisticamente diferentes ($P < 0,05$) do valor de índice de peróxido observado para óleo extraído por hidrólise enzimática (TABELA 1). Índice de peróxido indica oxidação lipídica (CREXI; SOUZA-SOARES; PINTO, 2009). Devido ao seu elevado teor de ácidos graxos poli-insaturados, incluindo o ácido eicosapentaenoico (EPA) e ácido docosahexaenoico (DHA), a taxa de oxidação do óleo de peixe é significativamente diferente da de outros óleos (HUSS, 1988). A presença destes ácidos graxos do óleo de peixe torna-o

susceptíveis a processos oxidativos, que afetam as suas características e valor nutricional quando submetidos a diferentes temperaturas e luminosidades durante o processamento e armazenamento (MORETTO; FETT, 1998). Contudo, os valores de Índice de peróxido dos óleos estudados (óleo extraído por metodologia Bligh & Dyer 10,75 mEq O₂/kg de óleo; óleo extraído por processo por cocção (método industrial) 10,45 mEq O₂/kg de óleo; óleo extraído por hidrólise enzimática 5,14 mEq O₂/kg de óleo), foram inferiores ao limite máximo de 15 mEq O₂/kg de óleo estabelecido pelo *Codex Alimentarius* para óleos brutos. Valores superiores ao dessa pesquisa foram observados para óleo de peixe agulha (*Belone belone*) (10,60 mEq O₂/kg de óleo), óleo de tainha (*Mugil auratus*) (11,3 mEq O₂/kg de óleo), óleo de savelha (*Alosa fallax*) (11,9 mEq O₂/kg de óleo) e óleos de chicharro (*Trachurus trachurus*) (11,2 mEq O₂/kg de óleo) (BORAN; KARAÇAM; BORAN, 2006).

Em relação ao índice de acidez (IA), um valor mais elevado ($P < 0,05$) foi observado no óleo extraído por processo de cocção (método industrial) (4,0 mg KOH/g) (TABELA 1). Acidez em óleo é um parâmetro de qualidade importante relacionada à presença de ácidos graxos livres (AGL) e outros compostos de ácidos não lipídicos. Os AGL são gerados, principalmente, por uma reação de hidrólise de triacilgliceróis, enquanto os compostos de ácidos não lipídicos, tais como o ácido acético, podem ser gerados durante a deterioração da matéria-prima. Assim, a acidez do óleo depende de vários fatores relacionados à composição do óleo, ao procedimento de extração e ao grau de frescor da matéria-prima. Geralmente, óleos preparados em temperaturas mais altas apresentaram maiores teores de ácidos graxos livres (RUBIO-RODRÍGUEZ *et al.*, 2012; CHANTACHUM; BENJAKUL E SRIWIRAT, 2000). Os valores de índice de acidez observados, no presente estudo, para óleo extraído por metodologia Bligh & Dyer (2,3 % ácido oleico) e óleo extraído por hidrólise enzimática (1,96 % ácido oleico), foram inferiores ou encontrados em óleo extraído de vísceras de carpa (*Cyprinus carpio*), obtido pelo método de Bligh Dyer (4,26 % ácido oleico) e pelo método de ensilagem ácida (6,63 % ácido oleico) (CREXI; SOUZA-SOARES; PINTO, 2009).

O índice de refração (IR) do óleo extraído por processo de cocção (método industrial) (1,4783 a 40 °C) foi diferente ($P < 0,05$) do observado para o óleo extraído por metodologia Bligh & Dyer (1,4807 a 40 °C) e do óleo extraído por hidrólise enzimática (1,4803 a 40 °C), como apresentado na TABELA 1. Os óleos e as gorduras possuem poderes de refringência diferentes e, de acordo com sua natureza, desviam com maior ou menor intensidade os raios luminosos que os atravessam. O índice de refração de uma gordura aumenta com o comprimento da cadeia hidrocarbonada e com o grau de insaturação dos ácidos graxos constituintes dos triglicerídeos (MORETTO *et al.*, 2002). Índices de refração iguais aos

observados para os óleos de cabeças de atum foram obtidos em óleo bruto (1,48 a 40 °C) e degomado (1,47 a 40 °C) de surubim híbrido (*Pseudoplatystoma corruscans* X *P. fasciatum*) (MENEGAZZO; PETENUCI; FONSECA, 2014).

Foi observada diferença significativa ($P < 0,05$) entre os valores de índice de iodo (II) dos óleos avaliados (TABELA 1). Os valores do índice de iodo estão associados ao grau de ácidos graxos insaturados (CREXI; SOUZA-SOARES; PINTO, 2009). Valores elevados para o índice de iodo podem indicar maior propensão à ocorrência de processos oxidativos na molécula do ácido graxo insaturado. Os índices de iodo observados neste estudo (21,27 - 62,11gI/100g de óleo) foram inferiores ao obtido para óleo de peixe palombeta (*Stromateus stellatus*), peixe lanterna (*Stenobranchius leucopsarus*) e peixe olho-de-vidro (*Hoplostethus atlanticus*) (87,7 – 92,3 gI/100g de óleo) (ENDO, TAGIRI-ENDO, KIMURA, 2005) e em óleos extraídos de cinco espécies de peixes de importância comercial na Malásia (178,71 – 190,36 gI/100g de óleo) (JASWIR *et al*, 2009).

5.2 PERFIL DE ÁCIDOS GRAXOS DOS ÓLEOS DE CABEÇAS DE ATUM OBTIDOS POR DIFERENTES MÉTODOS DE EXTRAÇÃO

A composição dos ácidos graxos (AG) dos óleos obtidos pelos três métodos avaliados – óleo extraído por processo de cocção (método industrial), óleo extraído por metodologia Bligh & Dyer e óleo extraído por hidrólise enzimática, além do óleo obtido pelo método padrão (óleo extraído por metodologia soxhlet) para efeito de caracterização – foi determinada por cromatografia gasosa e os resultados apresentados na TABELA 2.

TABELA 2 – PERFIL DE ÁCIDOS GRAXOS DOS ÓLEOS BRUTOS DE CABEÇA DE ATUM
OBTIDOS POR DIFERENTES MÉTODOS DE EXTRAÇÃO

| Ácidos graxos (g/100g) | OBD ¹ | OHE | OI |
|------------------------------|-------------------------------|-------------------------------|-------------------------------|
| C10:0 Cáprico | 0,00 | 0,00 | 0,00 |
| C11:0 Undecanoico | 0,00 | 0,00 | 0,00 |
| C13:0 Tridecanoico | 0,19 | 0,00 | 0,00 |
| C16:0 Palmítico | 7,25 | 21,37 | 26,87 |
| C16:1 Palmitoleico | 0,00 | 4,37 | 0,64 |
| C17:0 Heptadecanoico | 0,55 | 0,00 | 5,29 |
| C18:0 Esteárico | 0,11 | 6,03 | 6,62 |
| C20:0 Araquídico | 18,99 | 0,00 | 0,25 |
| C21:0 Heneicosanoico | 0,32 | 0,00 | 0,00 |
| C22:0 Behênico | 0,00 | 0,00 | 0,00 |
| C24:0 Lingnocérico | 0,00 | 1,65 | 0,00 |
| C14:0 Mirístico | 0,00 | 3,35 | 4,31 |
| C14:1 Miristoleico | 0,48 | 0,00 | 0,00 |
| C15:0 Ácido Pentadecanoico | 0,00 | 0,93 | 1,11 |
| C15:1 cis-10-Pentadecenoico | 0,16 | 0,00 | 0,00 |
| C20:1n9 cis-11-Eicosenoico | 0,85 | 0,00 | 0,51 |
| C22:1n9 Erúico | 0,00 | 2,30 | 2,15 |
| C17:1 cis-10-Heptadecenoico | 0,17 | 0,00 | 2,58 |
| C24:1 Nervônico | 0,00 | 0,00 | 0,00 |
| C18:1n9c Oleico | 69,12 | 20,97 | 18,61 |
| C18:2n6c Linoleico | 0,00 | 1,21 | 1,27 |
| C18:2n6t Linoleiaídico | 0,00 | 0,00 | 4,81 |
| 18:3n3 α -Linolênico | 0,11 | 3,14 | 1,21 |
| C18:3n6 γ -Linolênico | 0,00 | 0,00 | 0,47 |
| C20:3n6 cis-Eicosatrienoico | 0,00 | 0,00 | 0,00 |
| C20:4n6 Araquidônico | 0,12 | 1,51 | 0,36 |
| C20:5n-3 Eicosapentaenoico | 0,32 | 6,05 | 4,61 |
| C22:6n3 Docosahexaenoico | 1,27 | 27,15 | 18,34 |
| EPA + DHA | 1,593 ^d \pm 0,63 | 33,2 ^a \pm 0,52 | 22,95 ^b \pm 0,20 |
| Σ Saturados | 27,41 ^d \pm 0,43 | 33,33 ^c \pm 0,16 | 44,44 ^a \pm 0,17 |
| Σ Monoinsaturados | 70,78 ^a \pm 0,52 | 27,64 ^c \pm 1,13 | 24,49 ^d \pm 0,22 |
| Σ Poli-insaturados | 1,82 ^d \pm 0,83 | 39,06 ^a \pm 1,25 | 31,07 ^b \pm 0,33 |

¹OBD - Óleo extraído pelo método Bligh & Dyer; OHE - Óleo extraído pelo método de Hidrólise enzimática; OI - Processo de cocção (método industrial); Σ - Somatório.

Foram identificados vinte e três ácidos graxos nos óleos brutos estudados. No óleo extraído pela metodologia Bligh & Dyer, predominou o ácido oleico (69,12 %) (TABELA 2).

Devido a sua importância funcional, a predominância desse ácido graxo pode agregar valor ao óleo. Pesquisas demonstram que dietas ricas em ácido oleico estão associadas à redução do risco de diabetes tipo 2 (RYAN *et al.*, 2000; KIEN *et al.*, 2013). O ácido oleico foi identificado como o ácido graxo monoinsaturado (AGM) de maior concentração, também em óleos extraídos pelo método de produção de farinha de peixe e pelo método de silagem de carpa (*Cyprinus carpio*) (26,05 % e 26,01 %, respectivamente) (CREXI; SOUZA-SOARES; PINTO, 2009).

O óleo extraído por processo de cocção (método industrial) (OI) apresentou maior percentual de ácido palmítico (26,87 %) (TABELA 2). Este resultado corrobora dados da literatura como os apresentados por Wu; Bechtel (2008) que relatam que esse ácido graxo também foi predominante (14,9 %) em óleo bruto extraído de coprodutos de salmão (*Salmo salar*) e ratifica a teoria de que o ácido palmítico é o principal ácido graxo saturado (AGS) nos lipídeos de muitas espécies de peixes marinhos, constituindo cerca de 70 % dos AGS totais (ÖZOGUL *et al.*, 2009).

No óleo extraído por hidrólise enzimática predominou o ácido docosaheptaenoico (DHA) (27,15 %). O resultado obtido está de acordo com o observado por Visentainer *et al.* (2007), que cita que esse ácido graxo é mais representativo em óleos de diferentes espécies de atum (gênero *Thunnus*) do que em óleos de outras espécies de peixe. A predominância desse ácido graxo por suas propriedades profiláticas e terapêuticas (VAN DEN ELSEN *et al.*, 2013; VAN DEN ELSEN *et al.*, 2014) pode valorizar o óleo de cabeça de atum obtido por essa metodologia, possibilitando agregar valores à cadeia produtiva da atividade pesqueira.

5.3 COMPARAÇÃO DAS ANÁLISES FÍSICO-QUÍMICAS E PERFIL DE ÁCIDOS GRAXOS DOS ÓLEOS DE CABEÇAS DE ATUM OBTIDOS POR DIFERENTES MÉTODOS DE EXTRAÇÃO

Visando comparar os óleos de cabeças de atum obtidos por diferentes métodos de extração, os resultados das análises físico-químicas (Índice de acidez - IA, índice de Saponificação - IS, índice de iodo - II, Índice de refração - IR e índice de peróxido - IP) e o perfil de ácidos graxos desses óleos foram correlacionados através da análise de componentes principais (ACP) (FIGURA 1) – técnica que fornece um resumo das semelhanças e diferenças entre as amostras relativas à concentração de compostos de interesse (LU *et al.*, 2010).

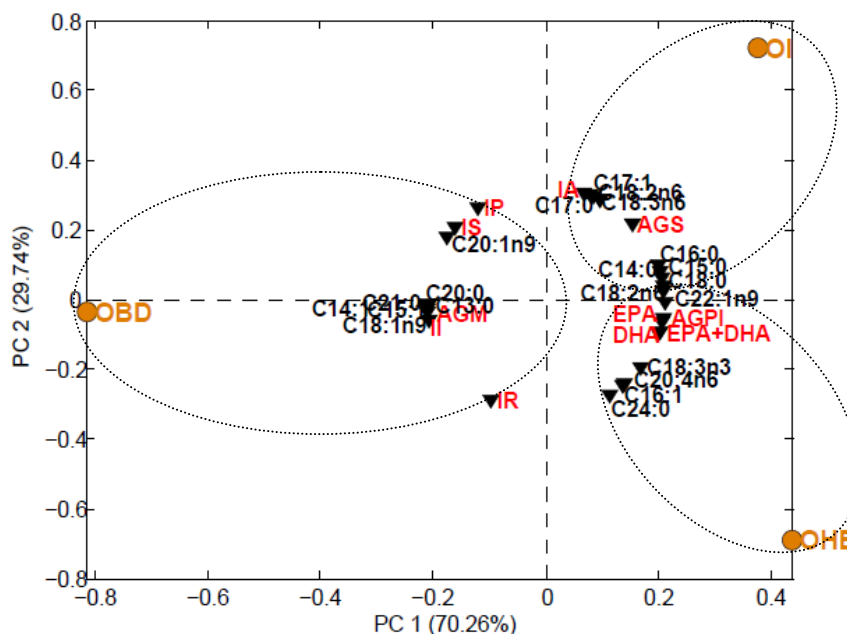


FIGURA 1 – ANÁLISE DE COMPONENTES PRINCIPAIS (ACP) DAS ANÁLISES FÍSICO-QUÍMICAS (ÍNDICE DE ACIDEZ - IA, ÍNDICE DE SAPONIFICAÇÃO - IS, ÍNDICE DE IODO - II, ÍNDICE DE REFRAÇÃO - IR E ÍNDICE DE PERÓXIDO - IP) E DO PERFIL DE ÁCIDOS GRAXOS DOS ÓLEOS OBTIDOS POR DIFERENTES MÉTODOS DE EXTRAÇÃO

*OBD - Óleo extraído pelo método Bligh & Dyer; OHE - Óleo extraído pelo método de Hidrólise enzimática; OI - Processo de cocção (método industrial); IR – Índice de Refração; IS – índice de Saponificação; IP – Índice de Peróxido; II – Índice de Iodo; AGS – ácidos graxos poli-insaturados; AGM – Ácidos graxos monoinsaturados; AGPI – ácidos graxos poli-insaturados e EPA + DHA - ácido docosahexaenoico, ácido eicosapentaenoico.

FONTE: O AUTOR

Em duas dimensões (CP1 X CP2), foi possível visualizar a correlação dos dados. A variância desses foi descrita pelas componentes principais CP1 e CP2. A CP1 explicou 70,26 % da variabilidade dos dados, já a CP2 foi responsável pela explicação de 29,74 % destes. Resultado próximo foi observado em análise de componentes principais das variações na qualidade sensorial de salsichas (convencionais e com teor de gordura reduzido), adicionadas de óleo de peixe (CÁCERES; GARCÍA; SELGAS, 2008). No experimento citado, a CP1 foi relativa a 58,36 % da variabilidade dos dados enquanto CP2 representou 26,62 %.

A análise de componentes principais (ACP) indicou que o óleo extraído por metodologia Bligh & Dyer (OBD), o óleo extraído por hidrólise enzimática (OHE) e o óleo extraído por cocção (método industrial) (OI) foram diferentes entre si, visto que, através do gráfico *biplot*, dispersão dos *scores* com os *loadings*, foi possível observar uma separação entre os óleos de cabeça de atum obtidos pelos diferentes métodos de extração estudados. Os

óleos foram separados, em função das similaridades e diferenças, em três pontos distintos da área de plotagem do gráfico, como mostra a FIGURA 1.

Através da análise de componentes principais (ACP), é possível observar que o óleo extraído pelo processo de cocção (método industrial) (OI) foi caracterizado principalmente pelo maior percentual de ácidos graxos saturados. Esse resultado está de acordo com o apresentado na TABELA 2, destacando-se ainda pelo maior valor do índice de acidez (IA), indicando boa correlação também com os dados descritos na TABELA 1. Na metodologia por cocção (método industrial) para obtenção de óleo de peixe, a digestão da matéria-prima é realizada pelo tratamento térmico, porém, por serem em sua maioria compostos por ácidos graxos poli-insaturados, os lipídeos do pescado são mais susceptíveis à oxidação recomendando-se, portanto, uma extração à baixa temperatura. O resultado evidenciado pela ACP ratifica a teoria que óleos preparados em temperaturas mais altas apresentaram maiores ácidos graxos livres e consequentemente maiores índices de acidez (IA), uma vez que esse é um parâmetro de qualidade importante relacionada à presença de ácidos graxos livres (AGL) (RUBIO-RODRÍGUEZ *et al.*, 2012; CHANTACHUM; BENJAKUL E SRIWIRAT, 2000).

No óleo extraído pela metodologia Bligh & Dyer (OBD), a análise de componentes principais (ACP) demonstrou que foi mais representativo o somatório de ácidos graxos monoinsaturados (AGM), bem como elevados índices de Peróxido (IP), de Saponificação (IS), de Iodo (II) e de Refração (IR). Observou-se que este último descritor foi plotado próximo também ao óleo extraído por hidrólise enzimática (OHE). Essa proximidade com ambos os óleos está relacionada ao valor semelhante de IR obtido nesses óleos, demonstrando coerência da ACP com os resultados apresentados na TABELA 1. Analisando a FIGURA 1, pode-se atribuir mais uma característica ao óleo (OBD), o mesmo localizou-se no ponto oposto à área de plotagem da maior parte dos ácidos graxos poli-insaturados (AGPI), indicando a baixa incidência desses ácidos graxos no referido óleo. Esse resultado pode ser confirmado pelos resultados apresentados na TABELA 2.

As características destacadas por meio da análise de componentes principais para o óleo extraído pela metodologia Bligh & Dyer (OBD) são: predominância de AGM, baixo percentual de ácidos graxos poli-insaturados (AGPI) e valores elevados de índices de qualidade, como o IP que está associado ao percentual de compostos de oxidação primária (hidroperóxidos) em óleos (TENGGU-ROZAINA; BIRCH, 2013). A partir disso, é possível inferir que os produtos químicos utilizados nessa metodologia de extração tenham influenciado e/ou alterado o perfil de ácidos graxos desse óleo, visto que, de acordo com a literatura, espécies de atuns (gênero *Thunnus*) são ricas em AGPI, em especial da série

ômega-3, como o ácido docosahexaenóico (DHA) (VISENTAINER *et al.*, 2007; CHOTIMARKORN, BENJAKUL; SILALAI, 2008; EOM *et al.*, 2010; AN; CHOE, 2012). Esse resultado está de acordo com as pesquisas de Xiao; Haugsgjerd (2012); Adeoti; Hawboldt (2014) e Vaisali *et al.* (2015), que observaram que alterações na eficiência da extração também podem influenciar os perfis de ácidos graxos, podendo ocorrer possível degradação do produto devido ao solvente utilizado. Portanto, as condições aplicadas ao processo, tais como reagentes químicos, podem promover a remoção de componentes desejáveis, como os ácidos graxos poli-insaturados.

O óleo extraído por hidrólise enzimática (OHE), de acordo com a análise de componentes principais (ACP), destacou-se sobretudo pelo somatório de ácidos graxos poli-insaturados (AGPI), em especial o ácido eicosapentaenoico (EPA), ácido docosahexaenoico (DHA) e valores de EPA+DHA, estando de acordo com os resultados descritos na TABELA 2, confirmando a eficiência da ACP em correlacionar esses dados. Além disso, através dessa análise, outra observação pode ser feita ao óleo obtido por essa metodologia (OHE): o mesmo situou-se em ponto oposto aos principais índices de qualidade avaliados nos óleos, sobretudo os índices de acidez (IA) e peróxido (IP), reafirmando o resultado observado na TABELA 1, que demonstra para o OHE os menores valores desses índices, indicando sua qualidade como ingrediente alimentar.

Pesquisas com diferentes proteases demonstram que não houve alteração significativa no perfil de ácidos graxos em óleo de pescado recuperado por hidrólise enzimática (DUMAY; BARTHOMEUF; BERGE, 2004; DUMAY *et al.*, 2009; RAI; BHASKAR; BASKARAN, 2013; HATHWAR *et al.*, 2011). Os resultados explicitados pela ACP para o OHE confirmam o estudo realizado por Dumay *et al.* (2004), por meio do qual, após a utilização de enzimas proteolíticas em coprodutos de bacalhau (*Gadus morhua*), os autores observaram, em comparação à extração clássica com solvente, uma elevação do percentual do ácido eicosapentaenoico (EPA) nos lipídeos totais.

Diante dessa correlação promovida pela ACP, entre as análises físico-químicas e o perfil lipídico dos óleos de cabeça de atum obtidos pelos métodos de extração avaliados, pode-se inferir que a baixa recuperação de ácidos graxos poli-insaturados (AGPI) em processos de extração pode ser vista como um indicativo de oxidação e perda de propriedade funcional do óleo. Esse resultado vai ao encontro do observado por Jabeen; Chaudhry (2011) e Xiao; Mjøs; Haugsgjerd (2012). Os autores perceberam que a proporção de ácidos graxos ômega-3:ômega-6 pode ser um indicador útil da qualidade e do valor nutricional em óleos de peixe por serem facilmente oxidados ou degradados por outras reações e por possuir

propriedades profiláticas e terapêuticas em diversas enfermidades e situações nutricionais amplamente demonstradas na literatura científica.

Comparando a qualidade dos óleos obtidos pelas metodologias de extração avaliadas neste experimento, o método via hidrólise enzimática pode ser considerado o que apresentou melhores características ao óleo de cabeça de atum, devido ao seu elevado percentual de AGPI, em especial da série ômega-3 como os ácidos eicosapentaenoico (EPA) e docosahexaenoico (DHA), característicos de espécies de atuns (gênero *Thunnus*) e menores valores de índices de qualidade, como IP e IA, indicando sua propriedade funcional e qualidade como ingrediente alimentar (VISENTAINER *et al.*, 2007; CHOTIMARKORN, BENJAKUL; SILALAI, 2008; EOM *et al.*, 2010; AN; CHOE, 2012).

Os resultados obtidos na comparação dessas metodologias de extração do óleo estão de acordo com as pesquisas realizadas por Chotimarkorn; Benjakul; Silalai (2008) e Wongsakul *et al.* (2003), que afirmam que a produção de óleo de peixe como fonte de ômega-3 envolve não só a procura de uma matéria-prima rica nesses ácidos graxos, como é o caso do atum, mas também o desenvolvimento de um processo de extração apropriado.

6 CONCLUSÃO

A análise de componentes principais foi uma técnica viável para fazer a comparação entre a qualidade de óleos de cabeças de atum extraídos por diferentes metodologias. Os resultados revelaram que os processos de extração por metodologia Bligh & Dyer e pelo método por cocção (industrial) pode ter influenciado o perfil de ácidos graxos dos óleos obtidos, principalmente nos teores de ácidos graxos poli-insaturados, sendo a metodologia de extração via hidrólise enzimática a que atribuiu as melhores características em relação à qualidade e à propriedade funcional do óleo, por apresentar maiores teores de ácido eicosapentaenoico (EPA) e ácido docosahexaenoico (DHA) e menores valores dos índices de qualidade analisados, como os índices de peróxido e acidez. Assim, a produção de óleo a partir de cabeças de atum via hidrólise enzimática pode promover a produção de óleo rico em ômega-3, o que pode ser uma boa oportunidade para valorizar coprodutos de peixe e possivelmente aumentar a competitividade da indústria pesqueira.

REFERÊNCIAS

AN, S.; CHOE, E. Effects of mustard oil addition to tuna oil-enriched emulsion on the oxidation under singlet oxygen. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, v. 1, p. 267–270, 2012.

ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS. **Official Methods of analysis of the Association of Official Analytical Chemists** (method 900.02). Arlington: A.O.A.C., chapter 44, p. 3, 1996.

ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS. **Official methods of analysis of the Association of Official Analytical Chemists**. Arlington: A.O.A.C., 16th ed., chapter 33, p. 10-12, 1995.

AOCS International. 1997. **Official Methods of Analysis**. Calculated Iodine Value: Cd 1c-85.

AOCS. AMERICAN OIL CHEMISTS SOCIETY. **Official Methods and Recommended Practices of the American Oil Chemists Society**. 4TH ED. CHAMPAIGN, USA, A.O.C.S. 1990.

AOCS. AMERICAN OIL CHEMISTS SOCIETY. **Official Methods and Recommended Practices of the American Oil Chemists Society**. 5TH. ED. CHAMPAIGN. 1998.

BALK, E. M.; LICHTENSTEIN, A. H.; CHUNGA, M.; KUPELNICK, B.; CHEWA, P.; LAUA, J. Effects of omega-3 fatty acids on serum markers of cardiovascular disease risk: a systematic review. **Atherosclerosis**. v. 189, p. 19–30, 2006.

BATISTA, I.; RAMOS, C.; COUTINHO, J.; BANDARRA, N. M.; NUNES, M. L. Characterization of protein hydrolysates and lipids obtained from Black scabbardfish (*Aphanopus carbo*) by-products and antioxidative activity of the hydrolysates produced **Process Biochemistry**, v. 45, p.18–24, 2010.

BELDA, M. C. R.; POURCHET-CAMPOS, M. A. Ácidos graxos essenciais em nutrição: uma visão atualizada. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 11, n. 1, p. 5-35, 1991.

BLIGH, E. G.; DYER, W. J. A rapid method of total lipid extraction and purification. **Canadian Journal Biochemistry Physiology**, v. 37, p. 911-917. 1959.

BORAN, G.; KARAÇAM, H.; BORAN, M. Changes in the quality of fish oils due to storage temperature and time. **Food Chemistry**, v.98, n.4, p.693–698, 2006.

CÁCERES, E.; GARCÍA, M. L.; SELGAS, M. D. Effect of pre-emulsified fish oil – as source of PUFA n₃ – on microstructure and sensory properties of mortadella, a Spanish bologna-type sausage. **Meat Science**, v. 80, p.183-193, 2008.

CARRERO, J. J.; MARTÍN-BAUTISTA, E.; BARÓ, L.; FONOLLÁ, J.; JIMÉNEZ, J.; BOZA, J. J.; LÓPEZ-HUERTAS, E. Efectos cardiovasculares de los ácidos grasos omega-3 y alternativas para incrementar su ingesta. **Nutrición Hospitalaria**, v. 20, n. 1, p. 63-69, 2005.

CHALAMAIAH, M.; HEMALATHA, R.; JYOTHIRMAYI, T.; DIWAN, P. V.; BHASKARACHARY, K.; VAJRESWARI, A.; KUMAR, R. R.; KUMAR, B. D. Chemical composition and immune modulatory effects of enzymatic protein hydrolysates from common carp (*Cyprinus carpio*) egg. **Nutrition**, v.31, p.388–398, 2015.

CHANTACHUM, S.; BENJAKUL, S.; SRIWIRAT, N. Separation and quality of fish oil precooked and non-precooked tuna heads. **Food Chemistry**, v.69, p.2089–2294, 2000.

CHOTIMARKORN, C.; BENJAKUL, S.; SILALAI, N. Antioxidative effects of rice bran extracts on refined tuna oil during storage. **Food Research International**, v. 41, p. 616–622, 2008.

CREXI, V. T.; SOUZA-SOARES, L. A.; PINTO, L. A. A. Carp (*Cyprinus carpio*) oils obtained by fish meal and ensilage processes: characteristics and lipid profiles. **International Journal of Food Science and Technology**, v.44, p.1642–1648, 2009.

DIETERICH, F.; BOSCOLO, W. R.; PACHECO, M. T. B.; SILVA, V. S. N. D.; GONÇALVES, G. S.; VIDOTTI, R. M. Development and Characterization of Protein Hydrolysates Originated from Animal Agro Industrial Byproducts. *Journal of Dairy, Veterinary & Animal Research*, v.1, n.2, p.1-7, 2014.

DUMAY, J.; ALLERY, M.; DONNAY-MORENO, C.; BARNATHAN, G.; JAOUEN, P.; CARBONNEAU, M. E.; BERGÉ, J. P. Optimization of hydrolysis of sardine (*Sardina pilchardus*) heads with protamex: enhancement of lipid and phospholipid extraction. **Journal of The Science of Food and Agriculture**, v. 89, n. 9, p. 1599 – 1606, 2009.

DUMAY, J.; BARTHOMEUF, C.; BERGÉ, J. P. How enzymes may be helpful for upgrading fish by-products: enhancement of fat extraction. **Journal Aquatic Food Product Technology**, v. 13, p. 69–84, 2004.

DUMAY, J.; DONNAY-MORENO, C.; BARNATHAN, G.; JAOUEN, P.; BERGE, J. P. Improvement of lipid and phospholipid recoveries from sardine (*Sardina pilchardus*) viscera using industrial proteases. **Process Biochemistry**, v.41, p. 2327–2332, 2006.

ENDO, Y.; TAGIRI-ENDO, M.; KIMURA, K. Rapid Determination of Iodine Value and Saponification Value of Fish Oils by Near-Infrared Spectroscopy. **Journal of Food Science**, v. 70, n. 2, p.C127-C131, 2005.

EOM, T.; KONG, C.; BYUN, H.; JUNG, W.; KIM, S. Lipase catalytic synthesis of diacylglycerol from tuna oil and its anti-obesity effect in C57BL/6J mice. **Process Biochemistry**, v. 45, p.738–743, 2010.

FAO. **The state of world fisheries and aquaculture 2014: opportunities and challenges**, Food and Agriculture Organization of The United Nations, Rome, 2014.

FAO-WHO, CODEX ALIMENTARIUS. **Codex standard for edible fats and oils not covered by individual standards, CODEX-STAN 19**. 1981, revisão 1999. Disponível em: http://www.codexalimentarius.net/web/standard_list.jsp. Acesso em: 11 de março de 2015.

GELEIJNSE, J. M.; GITAY, E. J.; GROBBEE, D. E.; DONDEERS, A. R. T.; KOK, F. J. Blood pressure response to fish oil supplementation: metaregression analysis of randomized trials. **Journal Hypertension**, v. 20, p. 1493–1499, 2002.

HARRIS, W. S. Fish oil supplementation: evidence for health benefits. **Cleveland Clinic Journal of Medicine**, v. 71, p. 208–221. 2004.

HARRIS, W. S.; MILLER, M.; TIGHE, A. P.; DAVIDSON, M. H.; SCHAEFER, E. J. Omega-3 fatty acids and coronary heart disease risk: clinical and mechanistic perspectives. **Atherosclerosis**, v. 197, p. 12–24, 2008.

HARRIS, W. S.; MOZAFFARIAN, D.; RIMM, E.; KRIS-ETHERTON, P.; RUDEL, L. L.; APPEL, LAWRENCE J.; ENGLER, M. M.; ENGLER, M. B.; SACKS, F. Omega-6 fatty acids and risk for cardiovascular disease. **Circulation**, v. 119, p. 902–907, 2009.

HATHWAR, S. C.; BIJINU, B. ; RAI, A. K.; NARAYAN, B. Simultaneous recovery of lipids and proteins by enzymatic hydrolysis of fish industry waste using different commercial proteases. **Applied Biochemistry Biotechnology**, v.164, p.115–124, 2011.

HUSS, H. H. **Fresh Fish Quality and Quality Changes**. Rome, Italy : FAO, 1988.

IVERSON, S. J.; LANG, S. L. C.; COOPER, M. H. Comparison of the Bligh and Dyer and Folch methods for total lipid determination in a broad range of marine tissue. **Lipids**, v.36, p. 1283–1287, 2001.

JABEEN, F.; CHAUDHRY, A. S. Chemical compositions and fatty acid profiles of three freshwater fish species. **Food Chemistry**, v.125, p.991–996, 2011.

JASWIR, I.; OSMAN, F.; KHATIB, A.; CHOWDHURY, A. J. K. Storage Stability of Fish Oil from Langkawi Island, Malaysia. **Food Science Technology Resouch**, v.15, n.6, p.591 – 598, 2009.

KIEN, C. L.; BUNN, J. Y.; POYNTER, M. E.; STEVENS, R.; BAIN, J.; IKAYEVA, O.; FUKAGAWA, N. K.; CHAMPAGNE, C. M.; CRAIN, K. I.; KOVES, T. R. A lipidomics analysis of the relationship between dietary fatty acid composition and insulin sensitivity in young adults. **Diabetes**, v.62, p.1054–1063, 2013.

KLINKESORN U, H-KITTIKUN A, CHINACHOTI P, SOPHANODORA P Chemical transesterification of tuna oil to enriched omega-3 polyunsaturated fatty acids. **Food Chemistry**, v.87, n.3, p.415–421, 2004.

KRIS-ETHERTON, P. M.; HARRIS, W. S.; APPEL, L. J. Fish consumption, fish oil, omega-3 fatty acids, and cardiovascular disease. **Circulation**, v. 106, p. 2747–2757, 2002.

LAPLANTE, S. SOUCHET, N.; BRYL, P. Comparison of low-temperature processes for oil and coenzyme q10 extraction from mackerel and herring. **European Journal Lipid Science Technology**, v. 111, p. 135–141. 2009.

LINDER, M.; FANNI, J.; PARMENTIER, M. Proteolytic extraction of salmon oil and pufa concentration by lipases. . **Mar Biotechnology**. v. 15, p. 70–76, 2005.

MAZEREEUW, G.; LANCTÔT, K. L.; CHAU, S. A.; SWARDFAGER, W.; HERRMANN, N. Effects of omega-3 fatty acids on cognitive performance: a meta-analysis. **Neurobiology of Aging**, v. 33, p. 1482.e17–1482.e29, 2012.

MENEGAZZO, M. L.; PETENUCI, M. E.; FONSECA, G. G. Production and characterization of crude and refined oils obtained from the co-products of Nile tilapia and hybrid sorubim processing. **Food Chemistry**, v.157, p.100–104, 2014.

MORETTO, E.; FETT, R. **Tecnologia de Óleos e Gorduras Vegetais na Indústria de Alimentos**. São Paulo: Livraria Varela; 1998, 150 p.

MORETTO, E.; FETT, R.; GONZAGA, L. V.; KUSKOSKI, E. M. **Introdução à ciência de alimentos**. Florianópolis: Ed. da UFSC, 2002, 255p.

NGUYEN, H. T. M. Y.; SYLLA, K. S. B.; RANDRIAMAHATODY, Z.; DONNAY-MORENO, C.; MOREAU, J.; TRAN, L. T.; BERGÉ, J. P. Enzymatic hydrolysis of yellowfin tuna (*Thunnus albacares*) by-products using protamex protease. **Food Technology and Biotechnology**, v. 49, p. 48-55, 2011.

O'FALLON J. V.; BUSBOOM J. R.; NELSON M. L.; GASKINS C. T. A direct method for fatty acid methyl ester synthesis: Application to wet meat tissues, oils, and feedstuffs. **Journal of Animal Science**, v.85, p.1511–1521, 2007.

ÖZOGUL, Y.; ÖZOGUL, F.; ÇÇEK, E.; POLAT, A.; KULEY, E. Fat content and fatty acid compositions of 34 marine water fish species from the Mediterranean Sea. **International Journal of Food Sciences and Nutrition**, v.60, n.6, p.464–475, 2009.

PHILLIPS, K. M.; RUGGIO, D. M.; AMANNA, K. R. Extended validation of a simplified extraction and gravimetric determination of total fat to selected foods. **Journal of Food Lipids**, v. 15, p.309–325, 2008.

RUBIO-RODRÍGUEZ, N.; DIEGO, S. M.; BELTRÁN, S.; JAIME, I.; SANZ, M. T.; ROVIRA, J. Supercritical fluid extraction of fish oil from fish by-products: A comparison with other extraction methods. **Journal of Food Engineering**, v.109, p.238–248, 2012.

RUSTAD, T. Utilization of marine by-products. **Electronic Journal Environment Agricultural and Food chemistry**, p. 458-463, 2003.

RYAN, M.; MCINERNEY, D.; OWENS, D.; COLLINS, P.; JOHNSON, A.; TOMKIN, G. H. Diabetes and the Mediterranean diet: a beneficial effect of oleic acid on insulin sensitivity, adipocyte glucose transport and endothelium-dependent vaso reactivity. **QJM: An International Journal of Medicine**, v. 93, p. 85–91, 2000.

SANHUEZA, J.; NIETO, S.; VALENZUELA, A. Acido docosahexaenoico (DHA), desarrollo cerebral, memoria y aprendizaje: la importancia de la suplementación perinatal. **Revista Chilena de Nutrición**, v. 31, p. 84-92, 2004.

SATHIVEL, S.; SMILEY, S.; PRINYAWIWATKUL, W.; BECHTEL P. J. Functional and Nutritional Properties of Red Salmon (*Oncorhynchus nerka*) Enzymatic Hydrolysates. **Journal of Food Science**, v. 70, n. 6, p. C401-C406, 2005.

SHAIKH, N. A. Assessment of various techniques for the quantitative extraction of lysophospholipids from myocardial tissues. **Analytical Biochemistry**, v. 216, p. 313–321, 1994.

SILVA, T. M.; MUNHOZ, R. P.; ALVAREZ, C.; NALIWAIKO, K.; KISS, Á.; ANDREATINI, R.; FERRAZ, A. C. Depression in parkinson's disease: a double-blind, randomized, placebo-controlled pilot study of omega-3 fatty-acid supplementation. **Journal of Affective Disorders**, v. 111, p. 351–359, 2008.

SOUZA, S. M. G.; ANIDO, R. J. V.; TOGNON, F. C. Ácidos graxos ômega-3 e ômega-6 na nutrição de peixes – fontes e relações. **Revista de Ciências Agroveterinárias**, v. 6, n. 1, p. 63-71, 2007.

VALENZUELA, A.; UAUY, R. Consumption pattern of dietary fats in Chile N-6 and n-3 fatty acids. **International Food Science Nutrition**, v. 50, p.127-133, 1999.

VAN DEN ELSEN, L. W. J.; BOL-SCHOENMAKERS, M.; VAN ESCH, B. C. A. M.; HOFMAN, G. A.; VAN DE HEIJNING, B. J. M.; PIETERS, R. H.; SMIT, J. J.; GARSSSEN, J.; WILLEMSSEN, L. E. M. DHA-Rich Tuna Oil Effectively Suppresses Allergic Symptoms in Mice Allergic to Whey or Peanut1–3. **The Journal of Nutrition and Disease**, v. 12, p.1970-1976, 2014.

VAN DEN ELSEN, L. W. J.; VAN ESCH, B. C.; HOFMAN, G. A.; VAN DE HEIJNING, B. J. M.; GARSSSEN, J.; WILLEMSSEN, L. E. M. Dietary long chain n-3 polyunsaturated fatty acids prevent allergic sensitization to cows milk protein in mice. **Clinical & Experimental Allergy**, v.43, p.798–810, 2013.

VISENTAINER, J. V.; NOFFS, M. D'A.; CARVALHO, P. O.; ALMEIDA, V. V.; OLIVEIRA C. C.; SOUZA, N. E. Lipid Content and Fatty Acid Composition of 15 Marine Fish Species from the Southeast Coast of Brazil. **Journal of the American Oil Chemists Society**, v.84, p.543–547, 2007.

WANG, C.; HARRIS, W. S.; CHUNG, M.; LICHTENSTEIN, A. H.; BALK, E. M.; KUPELNICK, B.; JORDAN, H. S.; LAU, J. N-3 fatty acids from fish or fish-oil supplements, but not Alpha - linolenic acid, benefit cardiovascular disease outcomes in primary- and secondary-prevention studies: a systematic review. **American Journal of Clinical Nutrition**, v. 84, p. 5–17, 2006.

WANG, Q.; LI, W.; HE, Y.; REN, D.; KOW, F.; SONG, L.; YU X. Novel antioxidative peptides from the protein hydrolysate of oysters (*Crassostrea talienwhanensis*). **Food Chemistry**, v.145, p. 991–996, 2014.

WONGSAKUL, S.; PRASERTSAN, P.; BORNSCHEUER, U. T.; H-KITTIKUN, A. Synthesis of 2-monoglycerides by alcoholysis of palm oil and tuna oil using immobilized lipases. **European Journal of Lipid Science and Technology**, v.105, n.2, p. 68-73, 2003.

WU, T. H.; BECHTEL, P. J. Salmon by-product storage and oil extraction. **Food Chemistry**, v.111, p.868–871, 2008.

XIAO L; MJØS S A; HAUGSGJERD B O. Efficiencies of three common lipid extraction methods evaluated by calculating mass balances of the fatty acids. **Journal of Food Composition and Analysis**, v. 25, p. 198–207, 2012.

CAPÍTULO 4 - REFINO E DESODORIZAÇÃO DO ÓLEO EXTRAÍDO DE CABEÇA DE ATUM POR HIDRÓLISE ENZIMÁTICA

REFINO E DESODORIZAÇÃO DO ÓLEO EXTRAÍDO DE CABEÇA DE ATUM POR HIDRÓLISE ENZIMÁTICA

1 RESUMO

Foi avaliado o efeito do refino químico e de desodorização frente ao perfil de ácidos graxos e às características físico-químicas e sensoriais do óleo de cabeças de atum obtido por hidrólise enzimática. Para extração enzimática, utilizou-se a enzima Alcalase (0,2 % de enzima em relação ao substrato), a 60 °C, pH 6,5, por 120 minutos. O refino químico do óleo bruto foi realizado por meio da degomagem, neutralização, lavagem, secagem, branqueamento e desodorização. Na desodorização, variou-se a temperatura e o tempo do processo. O refino químico foi satisfatório, porém, a temperatura e reagentes químicos aplicados favoreceram a remoção de ácidos graxos poli-insaturados. Os atributos de odor de peixe, de fritura e de rançoso foram os que mais contribuíram para a avaliação sensorial do óleo. As condições no processo de desodorização de 160 °C/1 h e de 200 °C/1 h foram as recomendadas para o óleo de cabeça de atum, rico em ácidos graxos poli-insaturados.

Palavras-chave: Refino químico, desodorização, perfil de ácidos graxos, avaliação sensorial do óleo, cabeça de atum.

REFINING AND DEODORIZING OF OIL EXTRACTED FROM TUNA BY-PRODUCT BY ENZYMATIC HYDROLYSIS

2 ABSTRACT

This study evaluated the effect of chemical refining and deodorizing in fatty acid profile and physico-chemical and sensory characteristics of the tuna oil by-products obtained by enzymatic hydrolysis. The enzymatic extraction was developed using the enzyme Alcalase (0.2 % enzyme/substrate) at 60 °C, pH 6.5, for 120 minutes. The chemical refining of crude oil was carried by degumming, neutralization, washing, drying, bleaching and deodorizing. In deodorizing diversified the temperature and process time. The chemical refining was satisfactory; however, the applied temperature and chemical reagents favor the extraction of polyunsaturated fatty acids. The fishy odor, frying and rancid attributes, most contribute to the sensory evaluation of oil. Deodorizing process conditions of 160 °C / 1 h and 200 °C / 1 h were those recommended for the oil tuna co-product, rich in polyunsaturated fatty acids.

Keywords: Chemical Refining, deodorization, fatty acid profile, sensory evaluation of oil by-product of tuna.

3 INTRODUÇÃO

O aproveitamento de resíduos da industrialização de pescado, também chamados de coprodutos, é pouco representativo e são destinados ao preparo de farinha de pescado para rações, um produto considerado de baixo valor comercial, ou então, são acumulados em tanques sem receber qualquer tipo de tratamento seguido de descarte nas imediações do local de processamento, causando contaminação ambiental (SEIBEL; SOUZA-SOARES, 2003). Os resíduos de peixe podem ser aproveitados para obtenção de um produto de maior valor agregado, o óleo de peixe, que pode ser produzido a partir de peixe inteiro, da fauna acompanhante (espécies sem valor comercial) da pesca, de ovas e coprodutos do processamento do pescado (ADEOTI; HAWBOLDT, 2014).

A produção convencional para a obtenção industrial de óleo de peixe para aplicação alimentícia é por aquecimento, prensagem e centrifugação (OLSEN; TOPPE; KARUNASAGAR, 2014). Contudo, a hidrólise enzimática tem sido um método alternativo para a extração de óleo de peixe de baixo custo, processo que favorece a liberação de lipídeos a partir da matriz de proteína, preservando o valor nutritivo de lipídeos para sua aplicação na indústria de alimentos (LINDER; FANNI; PARMENTIER, 2005). Estudos demonstrando a utilização do processo enzimático na extração de óleo de peixe têm sido realizados (DUMAY; BARTHOMEUF; BERGÉ, 2004; SLIZYTE; RUSTAD; STORRØ, 2005; DUMAY et al., 2006; LAPLANTE; SOUCHET; BRYL, 2009).

Os óleos de peixe são fontes de ácidos graxos poli-insaturados (AGPI) pertencentes à família ω -3, sobretudo o docosaheptaenoico e eicosapentaenoico, que são essenciais à dieta alimentar e de grande interesse por seus benefícios amplamente demonstrados (SOUZA; ANIDO; TOGNON, 2007; HARRIS *et al.*, 2008; SILVA *et al.*, 2008; HARRIS *et al.*, 2009; MAZEREEUW *et al.*, 2012). No entanto, o óleo bruto apresenta impurezas e outros compostos indesejáveis, tais como ácidos graxos livres (AGL), fosfolipídeos e compostos voláteis que afetam a estabilidade do produto de maneira adversa, sendo necessário o processo de refino para garantir a qualidade dos óleos para o consumo humano (VAISALI *et al.*, 2015).

O óleo de peixe para dieta humana é comercializado como suplementos alimentares, produtos farmacêuticos e ingredientes para a indústria alimentícia. Informações sobre a caracterização físico-química do óleo de peixe podem ser importantes para os produtores de óleo desses animais e indústrias de alimentos, uma vez que irá influenciar a qualidade e a aceitação dos consumidores no sentido de suplementos e de produtos alimentares

enriquecidos com óleo de peixe (TENGKU-ROZAINA; BIRCH, 2013). Nesse sentido, a importância dos ácidos graxos poli-insaturados ω -3, presentes no óleo de peixe, e das pesquisas sobre os métodos de refino do óleo poderão auxiliar as indústrias de pescado na escolha da tecnologia a ser usada (VAISALI *et al.*, 2015).

O método tradicional utilizado para melhorar as características do óleo tem sido o refino químico, que pode incluir as etapas de degomagem, neutralização, lavagem, clareamento (branqueamento e filtração) e desodorização (CUNHA; CREXI; PINTO, 2009; MENEGAZZO; PETENUCI; FONSECA, 2014). No entanto, a desodorização representa um passo crítico no processo de refino por utilizar alta temperatura, o que pode desencadear reações de degradação, quando se trata de ácidos graxos de cadeia longa, os quais são propensos à degradação térmica. E a temperatura é um parâmetro importante a ser controlado durante a desodorização do óleo de peixe a fim de evitar a deterioração (FOURNIER *et al.*, 2007).

Neste contexto, o objetivo desse Capítulo 4 foi avaliar o efeito das condições de processo do refino químico e da etapa de desodorização frente ao perfil de ácidos graxos e em relação às características físico-químicas e sensoriais do óleo obtido de cabeças de atum pelo método de hidrólise enzimática, visto que esse foi o método que apresentou melhor perfil de ácidos graxos e características químicas, conforme apresentado no Capítulo 3.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 MATERIAL

As cabeças de atum (*Thunnus albacares*), congeladas e acondicionadas em embalagem de rafia, foram gentilmente cedidas pela empresa Fishes Brazil (Espírito Santo, Brasil). O pescado foi identificado como sendo proveniente da costa espírito santense. A Alcalase 2.4L® foi obtida da Novozymes Latino Americana Ltda (Paraná, Brasil). E os reagentes de grau analítico foram adquiridos da Sigma (St. Louis, MO, USA).

4.2 EXTRAÇÃO DO ÓLEO DE CABEÇA DE ATUM PELO PROCESSO DE HIDRÓLISE ENZIMÁTICA

A metodologia utilizada para extração do óleo pelo processo de hidrólise enzimática está apresentada no CAPÍTULO 2, item 2.2.

4.3 REFINO DO ÓLEO BRUTO DE CABEÇA DE ATUM

O refino químico do óleo bruto obtido de cabeças de atum foi realizado em triplicata de acordo com a metodologia descrita por Crexi *et al.* (2010), seguido de cinco etapas descritas a seguir:

Degomagem - aproximadamente 30 g de óleo bruto foram submetidas a aquecimento uniforme a 80 °C em um frasco Kitassato de 250 mL de capacidade, utilizando uma chapa elétrica de aquecimento com agitador magnético (MARCONI). Adicionou-se 1 % de ácido fosfórico concentrado (85 %) sob agitação vigorosa (500 a 600 RPM) a 700 mmHg de pressão reduzida durante 30 minutos. Logo após, o óleo foi colocado em um bécker deixando a maior quantidade possível de impurezas no fundo do frasco Kitassato para serem descartadas. Centrifugou-se este óleo a 4427 x g (6000 RPM) durante 20 minutos para retirar as impurezas remanescentes (HERMLE - 78564 Wehingen - Germany).

Neutralização - O óleo degomado foi aquecido uniformemente a 40 °C em um Kitassato de 250 mL de capacidade utilizando uma chapa elétrica com agitador magnético (MARCONI) e neutralizou-se com adição de uma solução de NaOH 5N com 4 % de excesso. A quantidade de solução de NaOH 5 N requerida para este processo foi determinada da seguinte forma: determinou-se a quantidade de equivalentes químicos ácidos calculados a partir da porcentagem de acidez em ácido oléico do óleo degomado. Calculou-se a massa em gramas de uma quantidade igual de equivalentes químicos de NaOH, adicionando mais 4 % (excesso). A mistura foi submetida à agitação à velocidade baixa (aproximadamente 100 a 150 RPM) a 450 mmHg de pressão reduzida durante 10 minutos a 40 °C. Posteriormente, deixou-se o óleo em repouso para agilizar a decantação da borra e facilitar a separação. O óleo separado por decantação foi centrifugado a 4427 x g (6000 RPM) por 20 minutos para retirar as impurezas (borra) remanescentes.

Lavagem e secagem - Adicionou-se água a 95 °C em quantidade igual a 10 % da massa do óleo neutralizado, que foi mantido à temperatura ambiente e sob agitação de aproximadamente 200 RPM, por 10 minutos em um frasco Kitassato de 250 mL de capacidade. A água foi retirada com uma pipeta e toda a operação repetida três vezes. Logo após, foi realizada a secagem, a uma temperatura de 70 °C por 30 minutos.

Branqueamento - Adicionou-se no óleo uma mistura de terra ativada e carvão ativado em uma proporção de 9:1, em quantidade igual a 5 % da massa do óleo lavado e seco, com um tempo de contato de 20 minutos com agitação a velocidade de 200 RPM a 680 mmHg de pressão reduzida. Posteriormente o óleo foi retirado do Kitassato, cuidando-se que o carvão

ativado ficasse no fundo do frasco e centrifugado a 6000 RPM por 10 minutos com adição de 2,5 % de terra ativada em relação ao óleo. Após centrifugação, o óleo foi filtrado com papel Whatman No. 1, para eliminação dos últimos resíduos de carvão ativado.

4.3.1 Desodorização do óleo refinado de cabeça de atum

Para avaliar a influência do processo de desodorização nas características físico-químicas e sensoriais do óleo, foi utilizado um delineamento experimental composto central rotacional (DCCR). A condição experimental adotada utilizou o planejamento experimental fatorial 2^2 , contendo duas variáveis em dois níveis com triplicata do ponto central (nível zero). As duas variáveis foram: X_1 = temperatura do processo de desodorização (Temperatura) e X_2 = tempo de duração do processo de desodorização (Tempo), com dois níveis codificados (-1 e +1), conforme apresentado na TABELA 1. Foi mantida constante a agitação (200rpm) e pressão reduzida (650 a 700 mmHg). Os valores máximos e mínimos das variáveis foram escolhidos baseando-se em estudo descrito por Fournier *et al.* (2006b).

TABELA 1 – VARIÁVEIS INDEPENDENTES CODIFICADAS E REAIS (COM SEUS DIFERENTES NÍVEIS)

| Variáveis independentes | Níveis codificados e reais | | |
|-------------------------|----------------------------|--------|--------|
| | -1 | 0 | +1 |
| X_1 | 160 °C | 180 °C | 200 °C |
| X_2 | 1h | 2h | 3h |

X_1 (Temperatura do processo); X_2 (Tempo do processo); 0 = ponto central C; -1 = pontos mínimos; +1 = pontos máximos.

O planejamento experimental foi constituído por sete ensaios (TABELA 2) e teve como objetivo avaliar os efeitos das variáveis independentes: temperatura do processo de desodorização e tempo de duração do processo de desodorização sobre as variáveis dependentes (respostas): análises físico-químicas, análise sensorial e perfil de ácidos graxos poli-insaturados de cadeia longa dos óleos desodorizados de cabeça de atum.

TABELA 2 – PLANEJAMENTO FATORIAL 2^2 , COM 2 VARIÁVEIS EM 2 NÍVEIS (-1 E +1) ACRESCIDO DE TRÊS REPETIÇÕES NO PONTO CENTRAL, DO ÓLEO DESODORIZADO DE CABEÇA DE ATUM

| Ensaio | Níveis das variáveis codificadas e reais | |
|--------|--|---------------------------|
| | X_1 (Temperatura do processo) | X_2 (Tempo do processo) |
| 1 | - 1 (160 °C) | - 1 (1 h) |
| 2 | + 1 (200 °C) | - 1 (1 h) |
| 3 | - 1 (160 °C) | +1 (3 h) |
| 4 | +1 (200 °C) | +1 (3 h) |
| 5 (C) | 0 (180 °C) | 0 (2 h) |
| 6 (C) | 0 (180 °C) | 0 (2 h) |
| 7 (C) | 0 (180 °C) | 0 (2 h) |

X_1 = Temperatura do processo; X_2 = Tempo do processo; C = ponto central; 0 (zero): ponto central (C); + 1: ponto máximo; - 1: ponto mínimo;

4.4 CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA DO ÓLEO BRUTO REFINADO E DO ÓLEO DESODORIZADO DE CABEÇA DE ATUM

4.4.1 Índice de refração (IR)

O índice de refração do óleo foi obtido em um refratômetro de Abbé a 40 °C equipado com escala-padrão segundo o método AOCS Cc 7 - 25 (AOCS, 1990). As análises foram realizadas em triplicata.

4.4.2 Índice de saponificação (IS)

O índice de saponificação do óleo de peixe foi determinado segundo metodologia AOCS Cd 3-25 (AOCS, 1990). As análises foram realizadas em triplicata e os resultados foram expressos como índice de saponificação em mg KOH/mg de amostra.

4.4.3 Índice de peróxido (IP)

O índice de peróxido foi determinado segundo o método AOCS Cd 8-53 (AOCS, 1990). A análise foi realizada em triplicata e a concentração de peróxidos (mEq de O_2 /kg de óleo).

4.4.4 Índice de acidez (IA)

A determinação do índice de acidez do óleo foi realizada segundo metodologia AOCS Ca 5a-40 (AOCS, 1998). As análises foram realizadas em triplicata e os resultados expressos como índice de acidez em ácido oleico (% ácido oleico).

4.4.5 Índice de Iodo (II)

O índice de iodo foi determinado com base no perfil graxo dos ésteres obtidos, segundo método AOC Cd 1c-85 (AOCS, 1997) definido pela equação:

$$II \text{ (g iodo/g óleo)} = (\%C16:1 \times 0,9976) + (\%C18:1 \times 0,8986) + (\%C18 : 2 \times 1,810) + (\%C22 : 1 \times 0,7497).$$

As análises foram realizadas em triplicata e os resultados expressos como (g I/ 100g óleo).

4.5 DETERMINAÇÃO DO PERFIL DE ÁCIDOS GRAXOS DO ÓLEO BRUTO, REFINADO E DESODORIZADO DE CABEÇA DE ATUM

A metodologia utilizada para a determinação do perfil de ácidos graxos dos óleos bruto, refinado e desodorizado de cabeça de atum está descrita no CAPÍTULO 2, item 2.7.

4.6 ANÁLISE SENSORIAL DO ÓLEO DESODORIZADO DE CABEÇA DE ATUM

4.6.1 Análise Descritiva Quantitativa (ADQ)

Com o objetivo de mensurar a influência do processo de desodorização na qualidade sensorial do óleo refinado de cabeça de atum, as sete amostras de óleo desodorizadas foram avaliadas em relação ao atributo odor, pelo método de análise descritiva quantitativa (STONE e SIDEL, 1993), conforme as seguintes etapas: recrutamento e pré-seleção dos candidatos (FERREIRA *et al.*, 2000); levantamento dos descritores através da técnica de discussão em equipe (onde o grupo se reúne e discute os termos propostos até chegarem a um consenso sobre cada definição do termo descritivo proposto) (MEILGAARD; CIVILLE e CARR, 1999); treinamento realizado em quatro seções; seleção da equipe final de provadores com base no poder discriminativo e descritivo da sensação percebida dos indivíduos, na repetibilidade e no consenso com a equipe (DAMÁSIO & COSTELL, 1991) e avaliação das amostras (STONE; SIDEL, 2004).

As amostras de óleo (3g de óleo de cada amostra) foram avaliadas em duplicata de forma monádica e randomizadas à temperatura ambiente em copos inodoros e escuros, codificados com número de três algarismos, em quatro sessões para evitar a fadiga da percepção sensorial, baseando-se no estudo dos autores Serfert; Drusch; Schwarz (2010). Para o registro da intensidade dos descritores definidos, a equipe utilizou a mesma ficha de avaliação da etapa de seleção final (FIGURA 1). A média dos resultados foram plotados em gráfico radial, no qual cada atributo é um vetor que representa a linha da escala não estruturada de nove centímetros, de cada descritor do atributo odor para cada tratamento, conforme Stone; Sidel (2004).

ANÁLISE DESCRITIVA QUANTITATIVA (óleo de peixe)

Nome: _____

Data: ____/____/____

Você está recebendo uma amostra codificada de óleo de peixe e os padrões extremos dos atributos. Avalie a amostra segundo a intensidade do atributo de odor específico, assinalando com um traço vertical as escalas abaixo:

AMOSTRA _____

ODOR

▪ Peixe
Fraco |-----| Forte

▪ Fritura
Fraco |-----| Forte

▪ Ácido
Fraco |-----| Forte

▪ Rançoso
Fraco |-----| Forte

▪ Folha Verde
Fraco |-----| Forte

FIGURA 1 – FICHA UTILIZADA PARA O REGISTRO DA INTENSIDADE DOS DESCRITORES DEFINIDOS PELA EQUIPE SENSORIAL DA ANÁLISE DESCRITIVA QUANTITATIVA DAS AMOSTRAS DE ÓLEO DESODORIZADO DE CABEÇAS DE ATUM
FONTE: O AUTOR.

4.7 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os dados analíticos foram analisados estatisticamente pelo software STATISTICA 7.0 (Statsoft, Tulsa, USA), fornecendo os valores das médias, desvio padrão, análise de variância

(ANOVA), teste de comparação de médias (Teste de Tukey e teste t-Student ao nível de 5 % de significância).

Em relação à desodorização do óleo, para visualizar os efeitos das variáveis independentes e de suas interações sobre as respostas avaliadas, foi aplicada a análise de componentes principais (ACP). A técnica fornece um resumo das semelhanças e diferenças entre as amostras relativas à concentração de compostos de interesse (LU *et al.*, 2010). O *software* ORIGIN PRO 8.0 (Northampton, MA 01060, USA) foi utilizado para construir a matriz de dados e esses foram processados pelo *software* MATLAB version 7.1 (Mathworks Inc.).

5 RESULTADOS E DISCUSSÕES

5.1 CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA DOS ÓLEOS BRUTO E REFINADO DE CABEÇA DE ATUM.

Os valores dos índices de acidez (IA), de peróxido (IP), de iodo (II), de refração (IR), de saponificação (IS), do óleo bruto (OB) e do refinado (OR) de cabeças de atum obtidos através do método de hidrólise enzimática encontram-se discriminados na TABELA 3.

TABELA 3 – CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA DOS ÓLEOS BRUTOS E REFINADOS DE CABEÇA DE ATUM²

| Óleos | Análises físico-químicas | | | | |
|-----------------|------------------------------------|--|-----------------------------------|---------------------------------|------------------------------|
| | Índice de saponificação (mg KOH/g) | Índice de peróxido (mEq O ₂ /kg óleo) | Índice de acidez (% ácido oléico) | Índice de Iodo (g I/100 g óleo) | Índice de refração (a 40 °C) |
| OB ¹ | 164,21 ^{a*} ± 0,08 | 5,14 ^a ± 0,03 | 1,96 ^a ± 0,7 | 27,12 ^a ± 2,1 | 1,48003 ^a ± 0,01 |
| | 177,28 ^a ± 0,41 | 7,77 ^b ± 0,05 | 0,30 ^b ± 0,1 | 50,40 ^b ± 3,2 | 1,4777 ^a ± 0,03 |

¹OB – Óleo bruto; OR - Óleo refinado.

²Os resultados são valores médios de três determinações ± desvio padrão.

*Médias seguidas de letras minúsculas distintas nas colunas, diferem entre si pelo teste t-Student, a 5 % de significância.

O Índice de saponificação (IS) de óleos brutos e refinado de cabeças de atum não apresentou diferença significativa (164,21 mg de KOH/g e 177,28 mg de KOH/g, respectivamente) e foi semelhante ao encontrado para óleo de tainha (*Mugil auratus*) (176 mg de KOH/g) (BORAN; KARAÇAM; BORAN, 2006) e inferior ao obtido para óleos de tilápia

(*Oreochromis niloticus*) e surubim híbrido (*Pseudoplatystoma corruscans* X *P. fasciatum*) (194,9676 mg de KOH/g e 212,3032 mg de KOH/g, respectivamente) brutos e refinados (193,59 mg de KOH/g e 210,85 mg de KOH/g, respectivamente).

Um aumento ($P < 0,05$) do índice de peróxido (IP) foi observado após o processo de refino, atingindo um valor de 7,77 mEq O₂/kg para o óleo refinado. O índice de peróxido de óleo bruto (3,09 mEq O₂/kg óleo) de granadeiro azul (*Macruronus novaezelandiae*) também apresentou uma diferença significativa após o refino (15,02 mEq O₂/kg óleo) (TENGGU-ROZAINA; BIRCH, 2013). O índice de peróxido está associado ao percentual de compostos de oxidação primária (hidroperóxidos) em óleos (TENGGU-ROZAINA; BIRCH, 2013). O elevado teor de ácidos graxos poli-insaturados do óleo de peixe o torna susceptível à deterioração oxidativa, assim o índice de peróxido no óleo refinado provavelmente tenha sido influenciado pelo aquecimento (75-80 °C durante 10-30 min.) do óleo durante as etapas do processo de refino. Contudo, o índice de peróxido do óleo refinado permaneceu abaixo do exigido para o consumo humano de 8 mEq / kg (BORAN; KARAÇAM; BORAN, 2006).

A redução considerável ($P < 0,05$) do índice de acidez demonstra que a fase de neutralização do processo de refino químico foi satisfatória. O índice de acidez do óleo bruto para o refinado reduziu 85 % (de 1,96 para 0,3 %). Considera-se um valor significativo se comparado a outros estudos. Comportamento semelhante, por exemplo, foi observado por Menegazzo; Petenuci; Fonseca (2014) que, ao procederem o refino químico de óleo de tilápia (*Oreochromis niloticus*) e de surubim híbrido (*Pseudoplatystoma corruscans* X *P. fasciatum*), obtiveram uma redução de 95 % e 91 %, respectivamente. Outro resultado neste sentido foi encontrado por CREXI *et al.* (2010) que ao extraírem óleo de vísceras de carpas (*Cyprinus carpio*) obtiveram 97 % pelo método industrial de obtenção de farinha de peixe e 98 % pelo método de ensilagem.

Os valores do índice de iodo estão associados ao grau de ácidos graxos insaturados (CREXI; SOUZA-SOARES; PINTO, 2009). Foi observado um aumento significativo ($P < 0,05$) entre os valores de índice de iodo dos óleos bruto (27,12 g I/100 g óleo) e refinado (50,40 g I/100 g óleo). Essa diferença pode ser decorrente do aumento de ácidos graxos monoinsaturados (AGM) após o refino, o que de acordo com Menegazzo; Petenuci; Fonseca (2014) pode ser atribuído à remoção de substâncias indesejáveis no óleo, tais como resíduos e sabões que concentravam esses componentes. Valores altos de índice de iodo também foram observados em óleos refinados de tilápia (82,4690 g I/100 g) e óleo e surubim híbrido (80,0408 g I/100g óleo) (MENEGAZZO; PETENUCCI; FONSECA, 2014).

O índice de refração de uma gordura aumenta com o comprimento da cadeia hidrocarbonada e com o grau de insaturação dos ácidos graxos constituintes dos triglicerídeos (MORETTO *et al.*, 2002). Valores semelhantes ao índice de refração em óleo bruto de cabeça de atum (1,480) e óleo refino (1,478) foram observados por Menegazzo; Petenuci; Fonseca (2014), durante o refino químico de óleo de tilápia do Nilo e por Tengku-Rozaina; Birch (2013), entre óleo bruto e refinado de granadeiro azul (*Macruronus novaezealandiae*).

5.2 PERFIL DE ÁCIDOS GRAXOS DOS ÓLEOS BRUTO E REFINADO DE CABEÇA DE ATUM.

A composição de ácidos graxos foi analisada para ambos os óleos crus e refinado, para avaliar a influência do processo de refino químico no perfil de ácidos graxos do óleo de cabeça de atum. Os resultados são apresentados na TABELA 4.

TABELA 4 – PERFIL DE ÁCIDOS GRAXOS DOS ÓLEOS BRUTO E REFINADO DE CABEÇA DE ATUM

| Óleos | Ácidos Graxos | | | | | | | | | | |
|-------------------------|-----------------|--------|---------|---------|---------|---------|-------|---------------------------|-------|-------|---------------------------|
| | Saturados (AGS) | | | | | | | | | | |
| | C13:0 | C16:0 | C17:0 | C18:0 | C20:0 | C21:0 | C22:0 | C24:0 | C14:0 | C15:0 | ΣAGS |
| OB ¹ | 0 | 21,37 | 0 | 6,03 | 0 | 0 | 0 | 1,65 | 3,35 | 0,93 | 33,33 ^a ± 1,42 |
| OR | 0,18 | 21,69 | 4,18 | 1,29 | 0,12 | 2,35 | 0,22 | 0 | 0 | 0,96 | 30,03 ^b ± 1,01 |
| Monoinsaturados (AGM) | | | | | | | | | | | |
| | C16:1 | C14:1 | C17:1 | C20:1n9 | C22:1n9 | C24:1 | | C18:1n9c | | | ΣAGM |
| OB | 4,37 | 0 | 0 | 0 | 2,30 | 0 | | 20,97 | | | 27,64 ^a ± 1,50 |
| OR | 0 | 1,22 | 3,12 | 1,05 | 2,09 | 0,62 | | 27,72 | | | 36,78 ^b ± 0,81 |
| Poli-insaturados (AGPI) | | | | | | | | | | | |
| | C18:2n6c | 18:3n3 | C20:3n6 | C20:4n6 | C20:5n3 | C22:6n3 | | EPA + DHA | | | ΣAGPI |
| OB | 1,21 | 3,14 | 0 | 1,51 | 6,05 | 27,15 | | 33,20 ^a ± 1,05 | | | 39,06 ^a ± 0,21 |
| OR | 4,14 | 0,59 | 0,26 | 1,83 | 5,42 | 20,94 | | 26,36 ^b ± 0,84 | | | 33,18 ^b ± 0,09 |

¹OB – Óleo bruto; OR - Óleo refinado; ΣAGS – Somatório de ácidos graxos saturados; ΣAGM – Somatório de ácidos graxos monoinsaturados e ΣAGPI – Somatório de ácidos graxos poli-insaturados.

*Médias seguidas de letras minúsculas distintas nas colunas, referentes aos somatórios dos ácidos graxos saturados, monoinsaturados, poli-insaturados e EPA+DHA, diferem entre si pelo teste t-Student, a 5 % de probabilidade. *Os resultados são valores médios de três determinações ± desvio padrão.

No presente estudo, foi identificado no óleo bruto e refinado de cabeça de atum 23 ácidos graxos. O ácido palmítico (C16:0) encontrado foi o mais representativo no somatório de ácidos graxos saturados para ambos os óleos bruto e refinado, representando 64,11 % e 72,23 % do total dos ácidos graxos saturados, respectivamente. Esse resultado está de acordo com o percentual reportado para muitas espécies de peixes marinhos, cerca de 70 % de ácido palmítico nos ácidos graxos saturados totais (ÖZOGUL *et al.*, 2009). O ácido oleico encontrado foi responsável por 75,87 % do total de ácidos graxos monoinsaturado para o óleo bruto e 75,37 % para o óleo refinado. Tal constatação indica que o processo de refino não interferiu no elevado percentual desse ácido graxo. Logo, o percentual elevado de ácido oleico no óleo após o refino é um indício de qualidade funcional do produto, visto que pesquisas demonstram que dietas ricas em ácido oleico estão associadas à redução do risco de diabetes tipo 2 (RYAN *et al.*, 2000; KIEN *et al.*, 2013).

O somatório de ácidos graxos poli-insaturados apresentou maior percentual do ácido Docosahexadienoico (DHA) para o óleo bruto e óleo refinado (69,51 % e 79,44 %, respectivamente). A concentração de DHA no total de ácidos graxos poli-insaturados relatados neste estudo foram superiores aos observados em óleo bruto de atum (63,1 %) (TENGGU-ROZAINA; BIRCH, 2013) e óleo refinado de atum (61,06 %) (CHOTIMARKORN; BENJAKUL; SILALAI, 2008). O ácido docosahexaenoico (DHA) é considerado o ácido graxo poli-insaturado mais importante no desenvolvimento neonatal, é essencial para o desenvolvimento da retina e do cérebro do feto (BIRCH *et al.*, 2000; VALENZUELA; NIETO, 2003; SAN GIOVANNI; CHEW, 2005). Além disso, pesquisas demonstram que dieta rica em ácido docosahexaenoico (DHA) é eficaz na redução dos sintomas alérgicos (VAN DEN ELSEN *et al.*, 2013; VAN DEN ELSEN *et al.*, 2014). Portanto, o percentual desse ácido graxo poli-insaturado pode ser um indicador útil para a comparação de valores nutricionais relativos em óleos de peixe.

Foi observado um aumento significativo do total de ácidos graxos monoinsaturados de 24,85 % e consequente redução ($P < 0,05$) da soma dos ácidos graxos saturados no óleo refinado em comparação ao óleo bruto, o que pode ser atribuído à remoção de substâncias tais como resíduos e sabões, que concentravam os componentes (MENEGAZZO; PETENUCI; FONSECA, 2014). Comportamento semelhante foi relatado para óleo bruto e refinado de surubim híbrido (*Pseudoplatystoma corruscans* X *P. fasciatum*) (MENEGAZZO; PETENUCI; FONSECA, 2014) e óleo cru e purificado de abadejo do alasca (*Theragra chalcogramma*) (OLIVEIRA; MILLER, 2014).

Entretanto, redução significativa ($P < 0,05$) também foi encontrada no total de ácidos graxos poli-insaturados (AGPI) (15,05 %). Redução de AGPI em óleos refinados não é normalmente esperada. No entanto, é possível que os produtos químicos e a alta temperatura utilizados no processo de refino químico tenham promovido a destruição desses componentes desejáveis, como demonstram VAISALI *et al.* (2015). De acordo com os autores, o refino é um processo necessário, que garante a qualidade dos óleos alimentares para consumo humano, porém a remoção de componentes indesejáveis através do refino é crítica, uma vez que as condições aplicadas ao processo, tais como temperatura e reagentes químicos, também podem promover a remoção de componentes desejáveis, como os ácidos graxos poli-insaturados. Esse fato indica que existe a necessidade de melhorias na tecnologia tradicional de refino (VAISALI *et al.*, 2015).

5.3 CARACTERIZAÇÃO DOS ÓLEOS DESODORIZADOS DE CABEÇA DE ATUM.

5.3.1 Análise sensorial

As substâncias odoríferas em óleo geralmente são subprodutos da degradação de lipídeo, proteína e aminoácidos, que podem ser desencadeados por deterioração microbiana e auto-oxidação. Para solucionar tal problema, a desodorização é o processo adotado para remover aldeídos e cetonas que são responsáveis pelo odor característico de óleo de peixe, o que na maioria dos casos não é atraente para os consumidores (LIN *et al.*, 1990; OLIVEIRA; MILLER, 2014). Assim, dez julgadores pré-selecionados elaboraram, de forma consensual, cinco termos descritores para o atributo odor das amostras de óleo desodorizadas de cabeças de atum. Os descritores com suas respectivas definições e as referências utilizadas para o treinamento da equipe são apresentados na TABELA 5.

TABELA 5 – DESCRITORES PARA O ATRIBUTO ODOR, SUAS DEFINIÇÕES E REFERÊNCIAS INDICADOS PELA EQUIPE DE JULGADORES PARA O ÓLEO DE CABEÇA DE ATUM

| TERMO | DESCRITOR (ATRIBUTO) | DESCRIÇÃO | REFERÊNCIAS |
|-------------|-------------------------|---|---|
| ODOR | | | |
| PEIXE | | Aroma característico de pescado. | <u>Fraco</u> : Peixe (branco) fresco moído. <u>Forte</u> : Resíduos de peixe. |
| FRITURA | | Aroma característico de óleo no momento da fritura. | <u>Fraco</u> : Óleo de soja a Temperatura (T) ambiente. <u>Forte</u> : Óleos de fritura a T. ambiente. |
| ÁCIDO | | Leve ardência percebida na cavidade nasal ao inspirar o óleo. | <u>Fraco</u> : Molho de tomate. <u>Forte</u> : Vinagre. |
| RANÇOSO | | Aroma de gordura oxidada (alimento muito gorduroso velho). | <u>Fraco</u> : Peixe Salgado. <u>Forte</u> : Azeite de dendê. |
| FOLHA VERDE | | Frescor, percebido na cavidade nasal ao inspirar o óleo (aroma de orvalho matinal e grama verde). | <u>Fraco</u> : Grama verde inteira. <u>Forte</u> : Grama verde triturada. |

Descritores para óleo de peixe microencapsulado, selecionados por uma equipe de nove provadores treinados em análise descritiva quantitativa (SERFERT; DRUSCH; SCHWARZ, 2010) foram semelhantes aos apresentados para as amostras de óleo desodorizado de cabeça de atum. Os descritores odor rançoso, odor de fritura e odor ácido, selecionados para o óleo de cabeça de atum, também foram descritos por uma equipe de provadores treinados em análise descritiva quantitativa para óleos de coprodutos de peixe olho-de-vidro-laranja (*Hoplostethus atlanticus*), obtidos por diferentes métodos de extração (RUBIO-RODRÍGUEZ *et al.*, 2012).

Após o treinamento, realizado em quatro sessões, com a apresentação das amostras de referência definidas, para que os provadores estivessem na mesma região da escala, foram selecionados sete provadores que apresentaram maior poder discriminativo (P de $F_{amostra} \leq 0,50$), repetibilidade (P de $F_{repetição} \geq 0,05$) e consenso com a equipe sensorial (DAMÁSIO; COSTELL, 1991). Os sete provadores, bem treinados, avaliaram, em duplicata, as sete amostras de óleo desodorizadas em diferentes condições de tempo e temperatura, de acordo com o delineamento experimental. Para a melhor visualização das similaridades e das diferenças entre as médias atribuídas ao atributo odor pelos provadores treinados na avaliação das amostras de óleo desodorizado (OD) de cabeça de atum, os resultados foram expressos na forma de gráfico do perfil de odor (FIGURA 2).

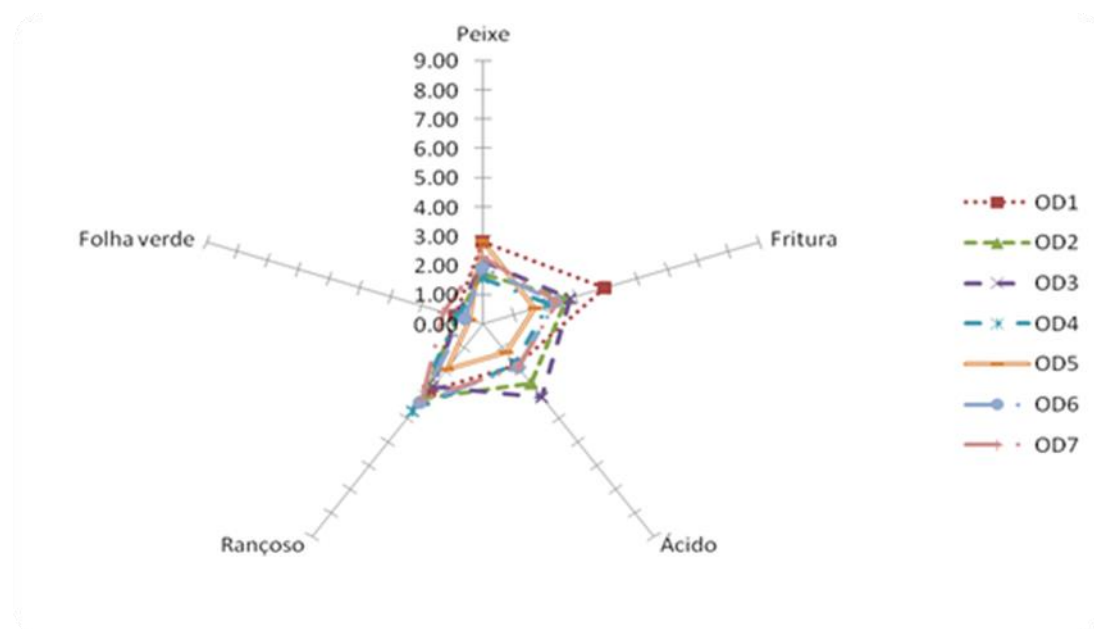


FIGURA 2 – GRÁFICO DO PERFIL DE ODOR DAS AMOSTRAS DE ÓLEO DESODORIZADO* DE CABEÇA DE ATUM

*OD1 - Óleo desodorizado (160 °C/1 h); OD2 - Óleo desodorizado (200 °C/1 h); OD3 - Óleo desodorizado (160 °C/3 h); OD4 - Óleo desodorizado (200 °C/3 h); OD5 - Óleo desodorizado (180 °C/2 h); OD6 - Óleo desodorizado (180 °C/2 h); OD7 - Óleo desodorizado (180 °C/2 h).

Fonte: o autor.

Não houve diferença significativa ($P < 0,05$) entre os perfis de odor dos óleos desodorizados estudados, indicando que, apesar do treinamento, é possível que a concentração baixa dos descritores presentes nas amostras dos óleos avaliados tenha sido a causa da dificuldade dos provadores em perceber diferenças entre as amostras. Entretanto, sabe-se que as condições do processo de desodorização podem afetar as propriedades sensoriais de óleo (RONNE; JACOBSEN; XU, 2006). O óleo desodorizado OD1 recebeu maior média para o odor fritura (3,96). Odor ácido (3,11) foi mais percebido no óleo desodorizado OD3 e odor de folha verde (1,28) foi mais expressivo no óleo desodorizado OD7 (FIGURA 2).

Compostos relacionados com odor, identificados em óleos de peixe comerciais por Sandgruber; Buettner *et al.* (2012), apresentam uma grande variedade de produtos de oxidação de ácidos graxos típicos, tais como alcenos e alcadienos, principalmente (E)-hex-2-enal, (Z)-hept-4-enal, (E)-oct-2-enal, (E)-non-2-enal, (E)-dec-2-enal, (E,E)-hepta-2,4-dienal, (E,E)-nona-2,4-dienal, (E,E)- e (E,Z)-nona-2,6-dienal e (E,E)-deca-2,4-dienal. No estudo realizado por Hartvigsen *et al.* (2000), em maionese enriquecida com óleo de peixe, isômeros (E, E) foram relacionados com o odor de fritura, enquanto isômeros (E, Z) foram associados

com odores verdes. Entretanto, no estudo citado, ambos os isômeros 2,4-octadienal foram associados a um impacto positivo sobre a qualidade sensorial, à medida que sua proporção aumentou ao longo do experimento. Logo, conforme mostra a FIGURA 2, a maior percepção do odor de fritura no óleo desodorizado OD1 pode ser considerada como um atributo sensorial positivo.

O óleo desodorizado OD4 foi o óleo que recebeu a menor média para odor de peixe (1,57) e maior média para odor rançoso (3,71). Propriedades sensoriais relacionadas com odor e sabor no óleo de peixe são fortemente dependentes da presença de compostos voláteis, tais como ácidos orgânicos, aminas ou aldeídos, responsáveis por odores indesejáveis nos óleos. Alguns destes compostos voláteis são produzidos durante o armazenamento do peixe ou deterioração por bactérias e/ou ação de enzimas sobre proteínas, aminoácidos e hidratos de carbono, e, portanto, sua presença no óleo pode ser atribuída ao grau de frescor da matéria-prima. É o caso da trimetilamina, responsável pelo odor de peixe, produzida pela ação de bactérias deteriorantes, tais como *Shewanella putrefaciens* (HUSS, 1995; RUBIO-RODRÍGUEZ *et al.*, 2012; VAISALI *et al.*, 2015).

Outros compostos voláteis, tais como hexanal ou nonanal, são, na sua maioria, gerados como consequência de um processo de auto-oxidação de lipídeos, que está relacionado com os parâmetros de extração do óleo, especialmente temperatura, exposição ao oxigênio, luz ou teor de metais (RUBIO-RODRÍGUEZ *et al.*, 2012). Portanto, apesar do óleo desodorizado OD4 apresentar um atributo sensorial positivo, menor percepção do odor característico de óleo de peixe, na maioria dos casos não é atraente para os consumidores (LIN *et al.*, 1990; OLIVEIRA; MILLER, 2014). Nesse óleo também foi percebido maior odor rançoso, conforme resultado apresentado na FIGURA 2, o que pode ter relação com processos oxidativos. Esse resultado evidencia a importância da correlação das análises sensoriais com índices de qualidade geral de óleos.

5.3.2 Avaliação dos efeitos das variáveis independentes (temperatura e tempo do processo de desodorização) sobre a análise sensorial, as análises físico-químicas e o perfil de ácidos graxos poli-insaturados de cadeia longa do óleo desodorizado de cabeça de atum

Em óleo de peixe, a qualidade sensorial não está associada apenas à presença de compostos de aroma específicos, mas também pode fornecer alguns indícios da qualidade geral do óleo e possivelmente refletir o estado oxidativo do próprio material (SANDGRUBER; BUETTNER *et al.*, 2012). O processo de refino e a composição química

desempenham um papel crítico para a qualidade do aroma final do óleo de peixe. Os ácidos graxos poli-insaturados de cadeia longa, presentes em abundância em óleo de peixes marinhos, são propensos a processos oxidativos e deterioram-se facilmente se não forem devidamente protegidos e armazenado (BEINDORFF; ZUIDAM, 2010;. WANG *et al*, 2011). Um exemplo da associação da análise sensorial com estado oxidativo de óleos é a identificação do aldeído alifático 3,6-nonadienal, que é um produto de decomposição derivado do ácido eicosapentaenoico (EPA). Esse aldeído alifático desempenha um papel importante nas propriedades sensoriais de óleo de peixe, já que tem sido associado ao sabor de folha verde (SULLIVAN; BUDGE, 2012).

Com o objetivo de avaliar a influência das diferentes condições de desodorização, segundo o delineamento experimental, frente aos ácidos graxos poli-insaturados presentes no óleo refinado de cabeça de atum, os perfis de ácidos graxos poli-insaturados de cadeias longas (AGPI-CL) (C20:4n6 Araquidônico – ARA; C20:5n-3 Eicosapentaenóico – EPA e C22:6n3 Docosahexaenóico - DHA) dos óleos desodorizados foram correlacionados com sua análise sensorial e físico-química através da análise de componentes principais (ACP), conforme demonstrado na FIGURA 3.

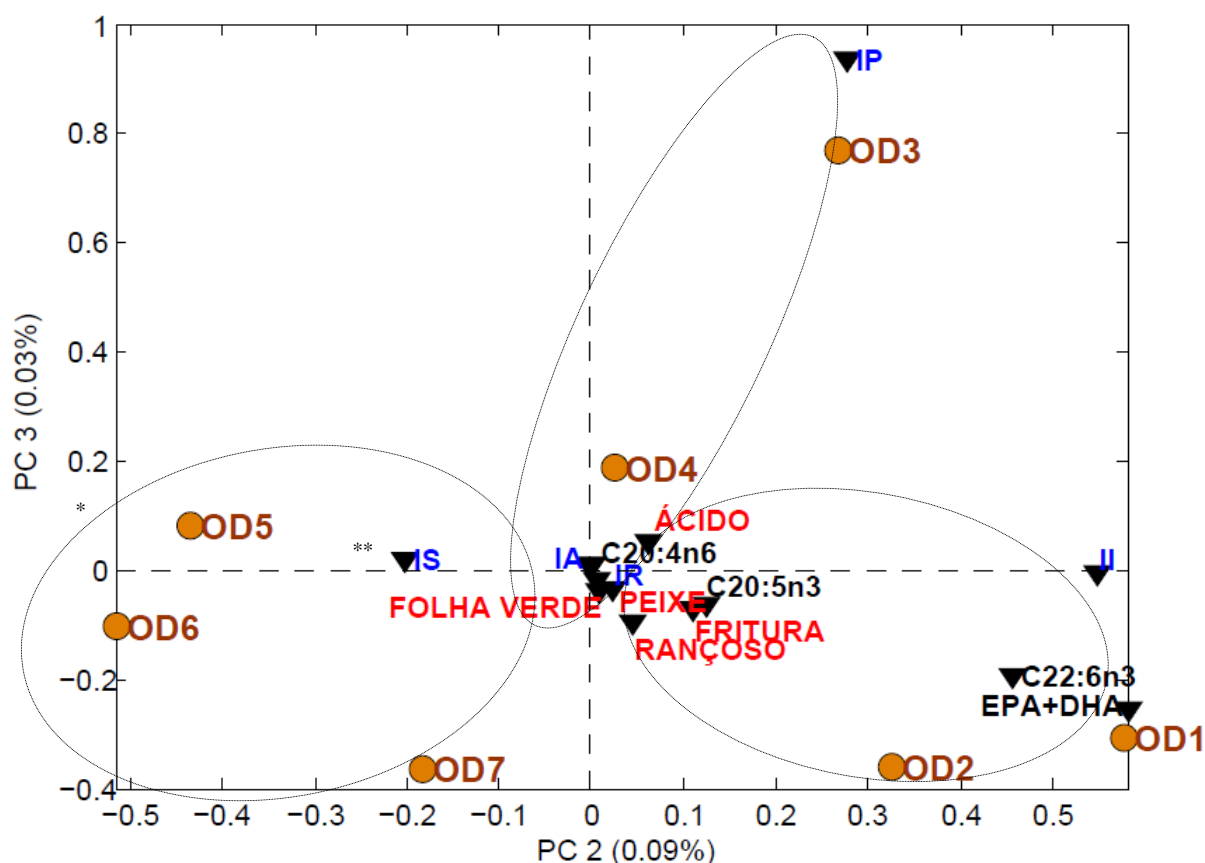


FIGURA 3 – ANÁLISE DE COMPONENTES PRINCIPAIS (ACP) DOS PERFIS DE AGPI DE CADEIAS LONGAS (Araquidônico-ARA, Eicosapentaenóico-EPA e Docosahexaenóico-DHA), CORRELACIONADOS COM AS ANÁLISES FÍSICO-QUÍMICAS E SENSORIAL DOS ÓLEOS DESODORIZADOS* DE CABEÇA DE ATUM

*OD1 - Óleo desodorizado (160 °C/1 h); OD2 - Óleo desodorizado (200 °C/1 h); OD3 - Óleo desodorizado (160 °C/3 h); OD4 - Óleo desodorizado (200 °C/3 h); OD5 - Óleo desodorizado (180 °C/2 h); OD6 - Óleo desodorizado (180 °C/2 h); OD7 - Óleo desodorizado (180 °C/2 h);

**IS – Índice de Saponificação; IA – Índice de Acidez; IR – Índice de Refração; IP – Índice de Peróxido; II – índice de Iodo.

FONTE: O AUTOR

A maior variância dos dados analisados foi descrita pelas componentes principais CP1, CP2 e CP3. A CP1 foi responsável por 99,86 % da variabilidade dos dados, a CP2 representou 0,09 % e a CP3 explicou 0,03 % dos dados. Apesar da CP1 representar a maior variabilidade dos dados (99,86 %), as similaridades e diferenças foram mais bem evidenciadas pelos componentes principais CP2 e CP3, indicando que a explicação dos dados foi percebida apenas nos detalhes. Portanto, os dados foram apresentados em duas dimensões, CP2 X CP3 (FIGURA 3). Avaliação dos dados semelhante ao desta pesquisa foi adotada em análise de componentes principais das alterações nos atributos sensoriais, aparência e odor de salmão (*Salmo salar*) defumado (LAKSHMANAN; MISKIN; PIGGOTT, 2005). No estudo citado, as CP1, CP2 e CP3 explicaram 71 % da variância dos dados, com CP1 explicando 36

%, CP2 23 % e CP3 13 %. Por concluir que as CP1 e CP3 evidenciaram melhor a explicação dos dados, os autores apresentaram os resultados também em duas dimensões CP1 X CP3.

O gráfico de dispersão *biplot*, *scores* com os *loadings*, das duas componentes principais CP2 e CP3 demonstram uma separação entre os óleos de cabeça de atum desodorizado. Em função das similaridades e diferenças, as amostras foram agrupadas em três pontos da área de plotagem do gráfico. Analisando esses grupos de óleos desodorizados formados pelas componentes principais CP2 e CP3, percebeu-se que os óleos desodorizados de cabeça de atum foram agrupados em relação à semelhante variável independente, tempo de duração do processo de desodorização, grupo OD3 e OD4 (3horas), grupo OD5, OD6, OD7 (2 horas) e grupo OD1 e OD2 (1h), indicando que essa variável independente foi a que teve maior influência sobre as variáveis dependentes: as análises físico-químicas, perfil de ácidos graxos de cadeia longa e análises sensoriais. Provavelmente, esta observação foi a principal responsável pela explicação dos dados, percebida apenas pelas componentes principais CP2 X CP3.

O grupo óleos desodorizados OD3 e OD4, foi formado pelos óleos expostos às condições de desodorização, tempo de 3 horas e temperaturas de 160 °C e 200 °C, repectivamente. Segundo a análise de componentes principais (ACP), esse grupo caracterizou-se positivamente pelo maior percentual do ácido graxo poli-insaturado (AGPI) C20:4n6 e menor percepção sensorial do odor de peixe, o que pode indicar a eficiência da desodorização. Esse resultado também foi percebido na análise sensorial apresentada na FIGURA 2, confirmando a eficácia da ACP em correlacionar os dados estudados. No entanto, apesar dessa característica positiva, o grupo também foi marcado pelos maiores índices de peróxido, de acidez, odor rançoso e odor ácido.

As maiores percepções de odor rançoso e odor ácido podem estar relacionadas ao maior índice de peróxido (IP), visto que, de acordo com Tengku-Rozaina; Birch (2013), o IP é uma medição dos compostos de oxidação primária, como os hidroperóxidos, em óleos. Temperaturas altas (160 °C e 200 °C, repectivamente) associadas a um longo tempo de processo de desodorização (3 horas) podem ter desencadeado a formação desses compostos de oxidação nos óleos desodorizados (OD3 e OD4). Esse resultado corrobora a teoria que, à temperatura ambiente, as insaturações presentes nos ácidos graxos reagem prontamente com o oxigênio para a formação de hidroperóxidos, os quais são instáveis. Esta reação é acelerada a altas temperaturas e na presença de íons de metais de transição. Os hidroperóxidos decompõem-se a produtos secundários, muitos de baixa massa molecular, voláteis e com

acentuadas propriedades olfativas, que conferem o “flavor” característico e desagradável de óleo de peixe rançoso (BOCKISCH, 1993; KULAS; OLSEN *et al.*, 2003).

Assim, diante dessas características relatadas para o grupo de óleos desodorizados (OD3 e OD4), evidenciadas pela análise de componentes principais, pode-se inferir que apesar da temperatura máxima de desodorização aplicada (200 °C) ser eficiente, reduzindo compostos considerados não atraentes para os consumidores, como o odor de peixe (LIN *et al.*, 1990; OLIVEIRA; MILLER, 2014), longos tempos de duração do processo de desodorização (3 horas) podem favorecer a degradação térmica de compostos desejáveis como os ácidos graxos poli-insaturados (AGPI) e, conseqüentemente, interferir nas características sensoriais do óleo desodorizado.

Esse resultado vai ao encontro dos estudos realizados por FOURNIER *et al.* (2007) e FOURNIER *et al.* (2006a), nos quais relataram que a temperatura pode ser considerada como parâmetro determinante a ser controlado durante a desodorização do óleo de peixe, uma vez que os AGPI, em específico o eicosapentaenoico (EPA) e docosahexaenóico (DHA), presentes em óleo de peixe, são propensos à oxidação quando submetidos a condições térmicas de desodorização, o que pode favorecer as reações de degradação específicas, tais como a ciclização, isomerização geométrica e polimerização. No entanto, em estudos sobre produtos de degradação formados a partir de ácidos graxos de cadeia longa durante desodorização de óleo de peixe (FOURNIER *et al.*, 2007), os autores perceberam que o tempo longo de reação favoreceu a formação de ésteres metílicos de ácidos graxos EPA e DHA, altamente isomerizados.

No grupo de óleos desodorizados OD5, OD6 e OD7, por se tratar do ponto central do experimento, os óleos receberam semelhante condição de processo na desodorização (tempo de 2 horas e temperatura de 180 °C). Através da análise de componentes principais (ACP), foi possível observar que esse grupo foi descrito pelo menor índice de refração, maior odor de peixe e maior odor de folha verde, indicando boa correlação com os resultados apontados pela análise sensorial. Outra característica pode ser atribuída a esse grupo de óleos desodorizados: o mesmo foi plotado no ponto oposto à área de plotagem da maior parte dos ácidos graxos poli-insaturados de cadeia longa (AGPI-CL), indicando a baixa incidência desses ácidos graxos nos óleos desodorizados OD5, OD6 e ODO7.

De acordo com Moretto *et al.* (2002), o índice de refração de uma gordura é influenciado pelo comprimento da cadeia hidrocarbonada e com o grau de insaturação dos ácidos graxos constituintes dos triglicerídeos. Logo, o menor índice de refração, observado nos óleos desodorizados, OD5, OD6 e OD7, provavelmente está relacionado ao menor valor

de AGPI-CL. Em relação ao odor de folha verde, pesquisas demonstram que esse atributo tem influência positiva sobre a caracterização sensorial de óleo de peixe (HARTVIGSEN *et al.*, 2000; SULLIVAN; BUDGE, 2012). Porém, no presente estudo, no grupo de óleos desodorizados OD5, OD6 e OD7, a percepção do odor de folha verde pode estar associada a maior percepção do odor de peixe, indicando influência negativa sobre a característica sensorial desses óleos.

Baseando-se em estudo sobre degradação térmica de ácidos graxos poli-insaturados durante o processo de desodorização de óleo de peixe, em que esse foi submetido a temperaturas de 180, 220 e 250 °C durante 3 horas, Fournier *et al.* (2006b) indicaram que a desodorização de óleos de peixe deve ser conduzida a uma temperatura máxima de 180 °C e sugeriram que esta temperatura parece ser menor do que a energia de ativação necessária para a polimerização e isomerização geométrica. Contudo, diferente do presente experimento, nenhuma avaliação sensorial foi relacionada com esses compostos gerados no óleo de peixe avaliado, indicando que no estudo citado a percepção sensorial foi negligenciada. Essa observação ratifica que apesar de alguns poucos estudos identificarem os compostos gerados na degradação térmica de ácidos graxos poli-insaturados durante o processo de desodorização de óleo de peixe (CAMACHO *et al.*, 2001 e FOURNIER *et al.*, 2006b), raros são os estudos relativos a produtos de oxidação do óleo de peixe e suas percepções sensoriais (SULLIVAN; BUDGE, 2012).

O grupo formado pelos óleos desodorizados OD1 e OD2 recebeu como condição de desodorização o menor tempo de processo estudado nesse experimento: 1 h e temperaturas de 160 °C e 200 °C, respectivamente. Com a análise de componentes principais (ACP), percebeu-se que o grupo apresentou valores mais representativos de índice de iodo, ácido eicosapentaenoico (EPA), ácido docosahexaenoico (DHA), EPA+DHA e odor de fritura, também observado na análise sensorial (FIGURA1). Valores altos de índice de iodo podem estar relacionados ao nível elevado de ácidos graxos insaturados, tais como EPA e DHA, observados nesses óleos, corroborando com os estudos de Endo; Tagiri-Endo; Kimura (2005).

Em relação ao odor de fritura, por esse atributo estar associado a um impacto positivo sobre a qualidade sensorial de óleo de peixe, de acordo com Hartvigsen *et al.* (2000), a sua percepção no grupo de óleos desodorizados OD1 e OD2, parece ter mascarado o odor de peixe, uma vez que, segundo a ACP, esse não foi um descritor citado do grupo de óleos desodorizados, indicando a qualidade sensorial positiva desses óleos. Segundo Serfert; Drusch; Schwarz (2010), estratégias eficazes para modificação do perfil sensorial do óleo de

peixe, tais como aromatizantes ou adição de compostos que mascarem odor, também podem ser aplicadas.

Apesar de terem sido empregadas altas temperaturas (160 °C e 200 °C), nas condições do processo de desodorização empregadas ao grupo formado pelos óleos desodorizados OD1 e OD2, o menor tempo de duração do processo de desodorização (1 h) parece ter preservado os valores dos ácidos graxos poli-insaturados de cadeia longa (AGPI-CL), como os ácidos eicosapentaenoico (EPA) e docosahexaenóico (DHA), havendo possivelmente a correlação da presença desses AGPI-CL com o odor de fritura, atributo que teve influência positiva sobre a qualidade sensorial desses óleos. Pode-se inferir aqui que em comparação às demais condições do processo de desodorização estudadas, as condições de desodorização 160 °C/1 h e 200 °C/1 h são as recomendadas para óleos de peixe rico em ácidos graxos poli-insaturados, como o óleo de cabeça de atum.

6 CONCLUSÃO

O refino químico aplicado ao óleo de cabeça de atum, obtido pelo método de hidrólise enzimática, apresentou resultados satisfatórios, garantindo sua qualidade como ingrediente alimentar. Porém, as condições aplicadas ao processo favoreceram a remoção de componentes desejáveis, como ácidos graxos poli-insaturados de cadeia longa (AGPI-CL), o que indica a necessidade de melhorias na tecnologia de refino aplicada. Os atributos de odor de peixe, odor de fritura e odor rançoso foram considerados os que mais contribuíram para a avaliação sensorial dos óleos desodorizados. A análise de componentes principais foi uma técnica válida para a avaliação dos efeitos da temperatura e tempo do processo de desodorização sobre a análise sensorial, as análises físico-químicas e o perfil de AGPI-CL desses óleos, indicando que, além da temperatura, a duração aplicada à desodorização também pode influenciar a degradação dos AGPI-CL e as suas características sensoriais, recomendando-se as condições de desodorização de 160 °C/1 h e 200 °C/1 h para óleos de peixe rico em AGPI-CL, como o óleo de cabeça de atum.

REFERÊNCIAS

- ADEOTI, I. A.; HAWBOLDT, K. A review of lipid extraction from fish processing by product for use as a biofuel. *Biomass and Bioenergy*, v.63, p.330-340, 2014.
- BEINDORFF, C. M.; ZUIDAM, N. J. Microencapsulation of fish oil. In N. J. Zuidam; V. Nedovic (Eds.), *Encapsulation technologies for active food ingredients and food processing*. New York: Springer, p. 161–185, 2010.
- BIRCH, E. E.; GARFIELD, S.; HOFFMAN, D. R.; UAUY, R.; BIRCH, D. G. A randomized controlled trial of early dietary supply of long-chain polyunsaturated fatty acids and mental development in term infants. *Developmental Medicine and Child Neurology*, v.42, n.3, p.174–181, 2000.
- BOCKISCH, M. Composition, Structure, Physical Data, and Chemical Reactions of Fats and Oils, Their Derivatives, and Their Associates. In:(Ed.). *Fats and Oils Handbook*. Champaign: AOCS Press, p.53-120, 1993.
- BORAN, G.; KARAÇAM, H.; BORAN, M. Changes in the quality of fish oils due to storage temperature and time. *Food Chemistry*, v.98, n.4, p.693–698, 2006.
- CAMACHO, M. L.; MENDEZ, M. V. R.; CONSTANTE, M. G.; CONSTANTE, E.G. Kinetics of the cis-trans isomerisation of linoleic acid in the deodorization and/or physical refining of edible fats. *European Journal of Lipid Science and Technology*, v.103, p. 85–92, 2001.
- CARRERO, J. J.; MARTÍN-BAUTISTA, E.; BARÓ, L.; FONOLLÁ, J.; JIMÉNEZ, J.; BOZA, J. J.; LÓPEZ-HUERTAS, E. Efectos cardiovasculares de los ácidos grasos omega-3 y alternativas para incrementar su ingesta. *Nutrición Hospitalaria*, v. 20, n. 1, p. 63-69, 2005.
- CHOTIMARKORN, C.; BENJAKUL, S.; SILALAI, N. Antioxidative effects of rice bran extracts on refined tuna oil during storage. *Food Research International*. v. 41, p. 616–622, 2008.
- CREXI, V. T.; MONTE, M. L.; SOARES, L. A. S.; PINTO, L. A. A. Production and refinement of oil from carp (*Cyprinus carpio*) viscera. *Food Chemistry*, v. 119, n. 1, p. 945–950, 2010.
- CREXI, V. T.; SOARES, L. A. S.; PINTO, L. A. A. Carp (*Cyprinus carpio*) oils obtained by fish meal and ensilage processes: Characteristics and lipid profiles. *International Journal of Food Science and Technology*, v. 44, p.1642–1648, 2009.
- DUMAY, J.; BARTHOMEUF, C.; BERGÉ, J. P. How enzymes may be helpful for upgrading fish by-products: enhancement of fat extraction. *Journal Aquatic Food Product Technology*, v. 13, p. 69–84, 2004.
- DUMAY, J.; DONNAY-MORENO, C.; BARNATHAN, G.; JAOUEN, P.; BERGE, J. P. Improvement of lipid and phospholipid recoveries from sardine (*Sardina pilchardus*) viscera using industrial proteases. *Process Biochemistry*, v.41, p. 2327–2332, 2006.

ENDO, Y.; TAGIRI-ENDO, M.; KIMURA, K. Determination of iodine and saponification values in fish oil by near-infrared spectroscopy. *Journal of Food Science*, v. 70, n. 2, p. c127-c131, 2005.

FOURNIER, V.; DESTAILLATS, F.; JUANEDA, P. DIONISI, F.; LAMBELET, P.; SÉBÉDIO, J.-L.; BERDEAUX, O. Thermal degradation of long chain polyunsaturated fatty acids during deodorization of fish oil. *European Journal of Lipid Science and Technology*, v.108, p. 33–42, 2006b.

FOURNIER, V.; DESTAILLATS, F.; JUANEDA, P. DIONISI, F.; LAMBELET, P.; SÉBÉDIO, J.-L.; BERDEAUX, O. Analysis of eicosapentaenoic and docosahexaenoic acid geometrical isomers formed during fish oil deodorization. *Journal of Chromatography A*, v. 1129, p. 21–28, 2006a.

FOURNIER, V.; DESTAILLATS, F.; JUANEDA, P. DIONISI, F.; LAMBELET, P.; SÉBÉDIO, J.-L.; BERDEAUX, O. Degradation products formed from long-chain PUFA during deodorization of fish oil. *Lipid Technology*, v. 19, n. 1, p. 9-11, 2007.

GBOGOURI, G. A.; LINDER, M.; FANNI, J.; PARMENTIER, M. Analysis of lipids extracted from salmon (*salmo salar*) heads by commercial proteolytic enzymes. *European Journal Lipid Science Technology*. v. 108, p. 766–775, 2006.

HARRIS, W. S.; MILLER, M.; TIGHE, A. P.; DAVIDSON, M. H.; SCHAEFER, E. J. Omega-3 fatty acids and coronary heart disease risk: clinical and mechanistic perspectives. *Atherosclerosis*, v. 197, p. 12–24, 2008.

HARRIS, W. S.; MOZAFFARIAN, D.; RIMM, E.; KRIS-ETHERTON, P.; RUDEL, L. L.; APPEL, LAWRENCE J.; ENGLER, M. M.; ENGLER, M. B.; SACKS, F. Omega-6 fatty acids and risk for cardiovascular disease. *Circulation*, v. 119, p. 902-907, 2009.

HARTVIGSEN, K.; LUND, P.; HANSEN, K. F.; HØLMER, G. Dynamic headspace gas chromatography/mass spectrometry characterization of volatiles produced in fish oil-enriched mayonnaise during storage. *Journal Agriculture Food Chemistry*, v. 48, p. 4858–4867, 2000.

HÉNON, G.; KEMÉNY, Z. K.; RECSEG, F.; ZWOBADA; KOVARI, K. Deodorization of Vegetable Oils. Part I: Modelling the Geometrical Isomerization of Polyunsaturated Fatty Acids. *Journal American Oil Chemistry Society*, v.76, p. 73-81, 1999.

HUSS, H. H. *Quality and Quality Changes in Fresh Fish*. FAO, Fisheries and Aquaculture Department, Rome (Italy), 1995.

KIEN, C. L.; BUNN, J. Y.; POYNTER, M. E.; STEVENS, R.; BAIN, J.; IKAYEVA, O.; FUKAGAWA, N. K.; CHAMPAGNE, C. M.; CRAIN, K. I.; KOVES, T. R. A lipidomics analysis of the relationship between dietary fatty acid composition and insulin sensitivity in young adults. *Diabetes*, v.62, p.1054–1063, 2013.

KULAS, E.; OLSEN, E.; ACKMAN, R. G. Oxidation of fish lipids and its inhibition with tocopherols. In: KAMAL-ELDIN, A. (Ed.). *Lipid Oxidation Pathways*. Champaign: AOCS Press, p.37-69, 2003.

LAKSHMANAN, R.; MISKIN, D.; PIGGOTT, J. R. Quality of vacuum packed cold-smoked salmon during refrigerated storage as affected by high-pressure processing. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, v.85, p.651–655, 2005.

LAPLANTE, S.; SOUCHET, N.; BRYL, P. Comparison of low-temperature processes for oil and coenzyme q10 extraction from mackerel and herring. *European Journal Lipid Science Technology*, v. 111, p. 135–141, 2009.

LIN, C. F.; HSIEH, T. C. Y.; CROWTHER, J. B.; BIMBO, A. P. Efficiency of removing volatiles from Menhaden oils by refining, bleaching and deodorization. *Journal of Food Science*, v. 55, p. 1669– 1972, 1990.

LINDER, M.; FANNI, J.; PARMENTIER, M. Proteolytic extraction of salmon oil and pufa concentration by lipases. *Mar Biotechnology*. v. 15, p. 70–76, 2005.

LU, X.; WEBB, M.; TALBOTT, M.; VAN EENENNAAM, J.; PALUMBO, A.; LINARES-CASENAVE, J. Distinguishing ovarian maturity of farmed white sturgeon (*Acipenser transmontanus*) by Fourier transform infrared spectroscopy: a potential tool for caviar production management. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v. 58, n. 7, p. 4056-4064, 2010.

MAZEREEUW, G.; LANCTÔT, K. L.; CHAU, S. A.; SWARDFAGER, W.; HERRMANN, N. Effects of omega-3 fatty acids on cognitive performance: a meta-analysis. *Neurobiology of Aging*, v. 33, p. 1482–1482. 2012.

MENEGAZZO, M. L.; PETENUCI, M. E.; FONSECA, G. G. Production and characterization of crude and refined oils obtained from the co-products of Nile tilapia and hybrid sorubim processing. *Food Chemistry*, v.157, p.100–104, 2014.

MORETTO, E.; FETT, R.; GONZAGA, L. V.; KUSKOSKI, E. M. *Introdução à ciência de alimentos*. Florianópolis: Ed. da UFSC, 2002, 255p.

OLIVEIRA, A. C. M.; MILLER, M. R. Purification of Alaskan Walleye Pollock (*Gadus chalcogrammus*) and New Zealand Hoki (*Macruronus novaezelandiae*) Liver Oil Using Short Path Distillation. *Nutrients*, v. 6, p. 2059-2076, 2014.

OLSEN, R. L.; TOPPE, J. KARUNASAGAR I. Challenges and realistic opportunities in the use of by-products from processing of fish and shellfish. *Trends in Food Science & Technology*. v.36, p.144-151, 2014.

ÖZOGUL, Y.; ÖZOGUL, F.; ÇÇEK, E.; POLAT, A.; KULEY, E. Fat content and fatty acid compositions of 34 marine water fish species from the Mediterranean Sea. *International Journal of Food Sciences and Nutrition*, v.60, n.6, p.464–475, 2009.

RONNE, T. H.; JACOBSEN, C.; XU, X. B. Deodorization of lipase-interesterified butterfat and rapeseed oil blends in a pilot deodorizer. *European Journal of Lipid Science and Technology*, v. 108, n. 3, p. 182–192, 2006.

RUBIO-RODRÍGUEZ, N.; DIEGO, S. M.; BELTRÁN, S.; JAIME, I.; SANZ, M. T.; ROVIRA, J. Supercritical fluid extraction of fish oil from fish by-products: A comparison with other extraction methods. *Journal of Food Engineering*, v.109, p.238–248, 2012.

RUSTAD, T. Utilisation of marine by-products. *Electronic Journal Environmental Agricultural and Food Chemistry*, p. 458–463, 2003.

RYAN, M.; MCINERNEY, D.; OWENS, D.; COLLINS, P.; JOHNSON, A.; TOMKIN, G. H. Diabetes and the Mediterranean diet: a beneficial effect of oleic acid on insulin sensitivity, adipocyte glucose transport and endothelium-dependent vaso reactivity. *QJM: An International Journal of Medicine*, v. 93, p. 85–91, 2000.

SAN GIOVANNI, J. P.; CHEW, E. Y. The role of omega-3 long-chain polyunsaturated fatty acids in health and disease of the retina. *Progress in Retinal and Eye Research*, v.24, n.1, p.87–138, 2005.

SANDGRUBER, S.; BUETTNER, A. Comparative human-sensory evaluation and quantitative comparison of odour-active oxidation markers of encapsulated fish oil products used for supplementation during pregnancy and the breastfeeding period. *Food Chemistry*, v. 133, p. 458–466, 2012.

SEIBEL, N. F.; SOUZA-SOARES, L. A. Produção de silagem química com resíduos de pescado marinho. *Brazilian Journal Food technology*, v.6, n.2, p. 333–337, 2003.

SERFERT, Y.; DRUSCH, S.; SCHWARZ, K. Sensory odour profiling and lipid oxidation status of fish oil and microencapsulated fish oil. *Food Chemistry*, v. 123, p. 968–975, 2010.

SILVA, T. M.; MUNHOZ, R. P.; ALVAREZ, C.; NALIWAIKO, K.; KISS, Á.; ANDREATINI, R.; FERRAZ, A. C. Depression in parkinson's disease: a double-blind, randomized, placebo-controlled pilot study of omega-3 fatty-acid supplementation. *Journal of Affective Disorders*, v. 111, p. 351–359, 2008.

SLIZYTE, R.; RUSTAD, T.; STORRØ, I. Enzymatic hydrolysis of cod (*Gadus morhua*) by-products – optimization of yield and properties of lipid and protein fractions. *Process Biochemistry*, v. 40, p. 3680–3692, 2005.

SOUZA, S. M. G.; ANIDO, R. J. V.; TOGNON, F. C. Ácidos graxos ômega-3 e ômega-6 na nutrição de peixes – fontes e relações. *Revista de Ciências Agroveterinárias*, v. 6, n. 1, p. 63–71, 2007.

SULLIVAN, J. C.; BUDGE, S. M. Fish oil sensory properties can be predicted using key oxidative volatiles. *European Journal Lipid Science Technology*, v. 114, p. 496–503, 2012.

TENGKU-ROZAINA, M. T.; BIRCH, E. J. Physicochemical characterisation and oxidative stability of refined hoki oil, unrefined hoki oil and unrefined tuna oil. *International Journal of Food Science and Technology*, v. 48, p. 2331–2339, 2013.

VAISALI, C.; CHARANYAA, S.; BELUR, D. P.; REGUPATHI, I. Refining of edible oils: a critical appraisal of current and potential Technologies. *International Journal of Food Science and Technology*, v.50, p.13–23, 2015.

VALENZUELA, A. B.; NIETO, S. K. Ácidos grasos omega-6 y omega- 3 en la nutrición perinatal: su importância em el desarrollo del sistema nervioso y visual. *Revista Chilena de Pediatría*, v.74, p.149-57, 2003.

WANG, H.; LIU, F.; YANG, L.; ZU, Y.; WANG, H.; QU, S. Oxidative stability of fish oil supplemented with carnosic acid compared with synthetic antioxidants during long-term storage. *Food Chemistry*, v. 128, n.1, p. 93–99, 2011.

CONCLUSÕES FINAIS

Com os resultados apresentados no Capítulo 2, conclui-se que a hidrólise enzimática de cabeça de peixe possibilitou a recuperação simultânea de óleo rico em ácidos graxos poli-insaturados e peptídeos antioxidantes, recuperados por um processo sustentável, ou seja, sem o uso de solventes. O conteúdo discorrido no Capítulo 3, ao comparar diferentes métodos de extração, evidenciou que o processo de extração influenciou o perfil de ácidos graxos dos óleos obtidos, principalmente nos teores de ácidos graxos poli-insaturados. Portanto, foi possível inferir que, por apresentar maiores teores de ácido eicosapentaenoico e ácido docosahexaenoico, o óleo obtido via hidrólise enzimática de cabeça de atum foi considerado de qualidade superior em relação ao óleo extraído por metodologia Bligh & Dyer, óleo extraído por metodologia Soxhlet e óleo extraído por processo cocção (método industrial).

Por fim, o Capítulo 4 permitiu demonstrar que o refino químico, aplicado no óleo obtido via hidrólise enzimática de cabeça de atum, por ser o processo de extração que apresentou um óleo de melhor qualidade comparado aos óleos obtidos por outros processos de extração estudados, apresentou resultados satisfatórios, garantindo sua qualidade como ingrediente alimentar. E que as condições estudadas de menor tempo do processo de desodorização foram consideradas como recomendadas para óleos de peixe rico em ácidos graxos poli-insaturados, como o óleo de cabeça de atum. Uma vez que essas condições parecem ter preservado os valores de ácidos graxos de cadeia longa, como os ácidos eicosapentaenoico (EPA) e docosahexaenoico (DHA), associa-se a presença desses compostos com um atributo odor positivo sobre a qualidade sensorial do óleo desodorizado de cabeça de atum.

Finalmente, conclui-se com este estudo que a produção de óleo de cabeça de atum, obtido pela metodologia de hidrólise enzimática, bem como o refino e uma desodorização, aplicada a baixo tempo de duração do processo desse óleo, apresentam-se como alternativas viáveis para valorizar os coprodutos provenientes do processamento dessa espécie de peixe. Foi possível demonstrar, ao final desse experimento, o aproveitamento sustentável de um coproduto da indústria pesqueira (cabeças de atum) para a obtenção de um óleo refinado e desodorizado, com alto valor agregado, por apresentar teores elevados de ácidos graxos essenciais EPA e DHA, com qualidade química e sensorial.